

Izolacija DNK molekule ovisno o vrsti materijala životinjskog podrijetla

Starček, Ksenija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:984183>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Ksenija Starček

**IZOLACIJA DNK MOLEKULE OVISNO O VRSTI MATERIJALA
ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

II

ZAVOD ZA VETERINARSKU BIOLOGIJU

Predstojnica: prof. dr. sc. Maja Popović

Mentori: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

prof. dr. sc. Maja Popović

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ksenija Vlahović
2. prof. dr. sc. Maja Popović
3. izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

III

Zahvaljujem se svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Danielu Špoljariću i prof. dr. sc. Maji Popović na savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Slijedeće, zahvaljujem se svojim prijateljima na ukazanoj potpori tokom izrade ovog diplomskog rada, kao i u toku cijelog studija.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, podršci i ohrabrenju.

IV

POPIS PRILOGA

POPIS SLIKA

Slika 1. Prostorija za izdvajanje DNK i RNK

Slika 2. Spektrofotometar

Slika 3. Elektroforeza u tijeku

Slika 4. Trasiluminator za vizualizaciju i slikanje produkata elektroforeze u gelu

Slika 5. Prostorija za pripremu PCR reakcije, pohranu kemikalija i PCR produkata te pohranjivanje i dokumentiranje gelova

Slika 6. PCR uređaj u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Veterinarskog fakulteta

Slika 7. PCR uređaj i PCR kabinet

Slika 8. Primjer prikaza rezultata sekvenciranja

Slika 9. Utvrđivanje genotipa mačke Snowball i mačjih dlaka sa jakne osumnjičenog pomoću kojeg je otkriven ubojica - slučaj poznat pod nazivom „Snowball case“

POPIS TABLICA

Tablica 1. Primjer PCR protokola od 35 ciklusa u GeneAmp PCR System 9 700 PCR uređaju

Tablica 2. Primjer početnica, vrsno specifične (species- specific) početnice za umnažanje citokrom b gena (Cyt b gene) mitohondrijske DNK u svrhu utvrđivanje porijekla mesa peradi i svinja

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	3
2.1.	Općenito o izdvajanju DNK.....	4
2.1.1.	Izdvajanje DNK s pomoću organskih otapala	4
2.1.2.	Metoda isoljavanja (<i>salting-out DNK extraction</i>)	7
2.1.3.	Metoda izdvajanja u gradijentima CsCl sa etidijevim bromidom	8
2.1.4.	Izdvajanje uz pomoć cetil trimetil amonij bromida (CTAB).....	9
2.1.5.	Izdvajanje DNK „Chelex“ 100 metodom.....	10
2.1.6.	Ekstrakcija nukleinskih kiselina solidnom fazom	12
2.1.7.	Izdvajanje DNK Qiagen metodom	14
2.1.8.	FTA tehnologija	15
2.2.	Kvantificiranje DNK	15
2.2.1.	Spektrofotometrija	16
2.2.2.	Elektroforeza kroz agarozni gel.....	18
2.2.3.	KapilaRNK elektroforeza	19
2.2.4.	Hibridizacijska (<i>slot-blot</i>) metoda.....	20
2.2.5.	Fluorometrija	21
2.2.6.	RT-PCR (<i>real time polymerase chaine reaction</i>).....	21
2.3.	Umnažanje i daljnje analize.....	23
2.3.1.	Lančana reakcija polimerazom.....	23
2.3.2.	Polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka	27
2.3.3.	Kratki ponavljajući sljedovi, STR (<i>Short Tandem Repeats</i>)	28
2.3.4.	Jednonukleotidni polimorfizmi (<i>single nucleotide polymorphism</i>).....	29
2.3.5.	Nova generacija sekvenciranja (NGS, <i>Next Generation Sequencing</i>).....	30
3.	RASPRAVA.....	31
4.	ZAKLJUČAK	34

5. LITERATURA.....	35
6. SAŽETAK.....	38
7. SUMMARY	40
7. ŽIVOTOPIS	41

1. UVOD

Zanimanje za mehanizam nasljeđivanja karakteristika potomstva postoji još od doba starih Grka. Zamijećeno je da se neke bolesti stalno i iznova javljaju u jednoj obitelji. Najutjecajnije teorije su predložili Aristotel i Hipokrat (inspiriran prethodnikom Anaksogoraksom). Aristotel je smatrao da se nematerijalni princip (forma, ideja organizma) ugrađuje u spermu muškarca i menstrualnu krv žene omogućujući razvoj djeteta. Hipokrat je smatrao da se nasljedne čestice skupljaju kroz tijelo i koncentriraju u gonadama što je kasnije u malo izmijenjenoj formi vjerovao i Charles Darwin (teorija pangenenze). Obojica, kao i skoro svi zapadni učenjaci, su smatrali da su stečene karakteristike također nasljedne. U 18.-om stoljeću, kako se povećavalo razumijevanje biljaka i životinja, uzgajivači biljaka su primijetili neke pravilnosti u nasljeđivanju karakteristika, ali, do Mendela, nitko ih nije opisao. Mendel je češki redovnik najpoznatiji po svojim eksperimentima sa graškom kojim je dokazao predvidljivost fenotipova i genotipova, kao i postojanje dominantnosti i recesivnosti, hetero- i homozigota, što se protivilo teoriji stapanja nasljednih svojstva koja je tvrdila da su potomci prosjek svojih roditelja. Mendel je rezultate svojih istraživanja objavio 1866. i ostala su zaboravljena dok nekoliko drugih istraživača nije naišlo na njih 1900.-te za potrebe svojih pokusa. Nasljedne čestice su prvo zvane pangeni dok 1905.-te Wilhem Johannsen nije uveo termin „geni“. Tri godine nakon što je Mendel objavio rezultate svojih istraživanja, švicarski liječnik Friedrich Miescher je izolirao slabe kiseline iz jezgra stanica koje je nazvao „nuclei“. To je bila prva izolacija DNK makar se njezina vrijednost još dugo nije prepoznala. Za gene se dokazalo da su smješteni na specifičnim mjestima (lokusima) na kromosomu kao i da ih je moguće transferirati drugom organizmu dok se još nije znala njihova točna građa i molekularni sastav, tj., vjerovalo se da su to proteini. Thomas Hunt Morgan je uveo *Drosophila melanogaster* kao idealni pokusni organizam za proučavanje nasljeđivanja svojstava. U svojim eksperimentima je otkrio spolno vezane gene, vezane gene koji se nasljeđuju skupa zbog svoje blizine na kromosomu, kao i fenomen rekombinacije. Sljedeće važno otkriće uslijedilo je 1944 godine kada je Oswald Avery sa suradnicima pokazao da su geni građeni od deoksiribonukleinske kiseline (AVERY i sur., 1944.). 1950. god. Erwin Chargaff je ustanovio da su koncentracije pirimidina i purina uvijek iste u DNK različitih organizama, kao i da su uvijek u istom omjeru jedna naspram druge, 50:50 (CHARGAFF i sur., 1950.). Watson i Crick su, na temelju rezultata nekih prijašnjih eksperimenata i saznanja o kemiji DNK, predložili

dvostruku uzvojnica kao vjerojatni model građe DNK (WATSON J. D., 1953.). Skupa, sva ta otkrića čine centralnu dogmu molekularne biologije koja kaže da proteini nastaju translacijom RNK koja pak nastaje transkripcijom DNK.

Danas znamo da se DNK sastoji od dva polinukleotidna lanca međusobno povezanih vodikovim vezama koji su suprotno orijentirani. Nukleotid je osnovna informacijska jedinica koja se sastoji od jedne od četiri dušične baze, adenina, gvanina, citozina ili timina, te šećera deoksiriboze i fosfatne skupine. Baze se uvijek spajaju istim načelom, dakle citozin s gvaninom, te timin s adeninom. Osim tih vodikovih veza, nukleotidi jedne uzvojnice su povezani fosfodieterskim vezama. Obje uzvojnice nose istu biološku informaciju i organizirane su u tjelešca zvana kromosomi čiji je broj vrsno specifičan. Na osnovu organizacije nasljedne tvari razlikuju se dva osnovna tipa stanica, prokarioti i eukarioti. Prokariotske stanice su većinom bakterijske i njihova DNK je slobodna u citoplazmi ako jednolančani, cirkularni kromosom zvan nukleoid. To je genomska DNK kojoj su pridruženi nekoliko desetaka ili stotina kružnih molekula, plazmida. Eukarioti, s druge strane, imaju nasljedni materijal smješten u jezgri obavijenoj posebnom dvostrukom jezgrenom membranom.

Za bilo koji postupak sa DNK, najvažnije je pravilno uzeti uzorak, pogotovo za potrebe forenzičke analize. U području gdje se izuzima uzorak, ništa se ne smije dirati bez rukavica, treba se izbjegavati kihanje i kašljanje, svaki uzorak se uzima sa novim rukavicama i pohranjuje u zasebnu vrećicu, i to papirantu, jer se u plastičnoj kondenzira voda što uništava uzorak. Tragovi krvi i ejakulata se moraju posušiti prije spremanja, a tragovi na podu, zidu i drugim površinama, se trljaju vlažnom vatom koja se posuši i spremi. Biološki uzorci se najbolje pohranjuju u suhim i hladnim uvjetima, te ih se treba što prije dostaviti u laboratorij. Tamo se najčešće čuvaju na 4°C, ili u ledenici na -20°C.

Moderna znanost o genetici na razini DNK se zove molekularna biologija i nova otkrića su se brzo zaredala. Genomika se izdvojila kao interdisciplinarna znanost koja izučava strukturu, funkciju i evoluciju cijelog genoma, a ne samo jednog gena. 1982.-e, u SAD-u, je odobrena primjena humanog inzulina proizvedenog tehnologijom rekombinantne DNK. Godinu poslije još jedan veliki skok, Kary Banks Mullis je, sa suradnicima iz Odjela za humanu genetiku Korporacije Cetus, izumio lančanu reakciju polimerazom omogućivši jednostavnu i brzu amplifikaciju ciljnih dijelova DNK. 1998. god. je isti tim znanstvenika zamijenio DNK-

polimerazu dobivenu iz *E. coli* termostabilnom DNK polimerazom iz bakterije *T. aquaticus*, koja se koristi i danas (SEIKI i sur., 1988.). 1985. god. Alec Jeffrey je ustanovio da se određene ponavljajuće sekvencije DNK razlikuju od osobe do osobe, što je rezultiralo rješavanjem prvog forenzičkog slučaja primjenom analize DNK i razvoja tehnike DNK profiliranja (JEFFREYS i sur., 1985.). Osim što je ova tehnologija pomogla pronaći krivce u mnogim slučajevima, također je korištena kako bi se mnogi pogrešno osuđeni oslobodili. P. A. Sharp i R. Roberts su, svaki za sebe, 1977.-te dokazali da se DNK sastoji od introna i eksona, odnosno da neki dijelovi DNK ne kodiraju proteine i da se „izrezuju“ iz glasničke RNK prije njene translacije u protein, te su 1993. god. podijelili Nobelovu nagradu za to otkriće (CHOW i sur. 1977.; BERGET i sur., 1977.). S obzirom da se glasnička RNK može izrezati na više alternativnih načina, to znači da iz jedne mRNK koja je izašla iz jezgre može nastati nekoliko raznih proteina i da je sveukupnost proteina nekog organizma veća od zbroja njegovih funkcionalnih gena.

Sljedeći vrijedan doseg molekularne biologije se dogodio 1997. god. kada je kloniran prvi sisavac, poznata ovca Dolly, ali unatoč fascinantnom napretku, jedan dio javnosti je reagirao krajnje zabrinuto i negativno zbog „ljudskog igranja Boga“. Danas je kloniranje kućnih ljubimaca unosan posao koji raste i moguće je komercijalno klonirati psa, mačku i konja. Klonirane životinje su samo fenotipski iste svojim prethodnicima, a kod mačaka ni to ne mora biti slučaj, dok se narav se može uvelike razlikovati. 2001.-e su *Human Genom Project* i *Celera Genomics* istovremeno objavili prvu nepotpunu sekvencu ljudskog genoma koja je, do 2003. god., 99% završena. Paul Hebert je 2003.-e standardizirao molekularnu identifikaciju vrste u procesu poznatom „DNK barcodig“ (HEBERT i sur., 2003.). Marker predložen za životinje je regija citokrom oksidaze 1 koja se umnaža i sekvencira kako bi se odredila vrsta i njezin stupanj srodnosti sa drugim vrstama. Stvorene su mnoge internetske baze podataka koje arhiviraju sekvence dosad obrađenih vrsta i svakodnevno nadopunjuju, a među njima je najpoznatija BOLD (*The Barcode of Life Data System*) osnovana 2007.

Razvoj tehnologija nove generacije sekvencioniranja „NGS“ (*New Generation Sequencing*) je širom svijeta u velikom zamahu čime se otvara mogućnost novih dosega i na području veterinarske medicine. Prednost tehnologije NGS povezana je se neograničenim uvidom u genetske informacije različitih organizama, preciznijom analizom njihovih genoma te primjenom u novim znanstvenim disciplinama poput metagenomike, epigenomike, transkriptomike i proteomike (VLAHOVIĆ i sur., 2020.).

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Općenito o izdvajanju DNK

Izolacija nukleinskih kiselina je rutinski postupak u molekularnoj biologiji i forenzici. Za kemijske metode postoje brojni komercijalni kompleti čiji pravilni odabir i optimizacija po potrebi mogu bitno uštediti vrijeme postupka. PCR je najčešće mjerilo uspješnosti izdvajanja željene molekule. Sljedeće najčešće metode su Chelex i izdvajanje na solidnoj fazi koja je obično silika. Sve one imaju zajedničke korake: stanična i jezgrena opna se razbijaju i oslobađa se sadržaj stanice. Ono nepotrebno, proteini, lipidi i drugi stanični sadržaj, osim nukleinskih kiselina, se mora ukloniti. Nukleinske kiseline se raznim načinima izdvajaju u što čistijem obliku.

2.1.1. Izdvajanje DNK s pomoću organskih otapala

Ovom se metodom uklanja velika količina proteina i ostalih molekula koje se oslobađaju pri izolaciji DNK. Izdvojena DNK ostaje sačuvana u velikim količinama i čišća je nego u drugim metoda ekstrakcije. Također, ova je metoda najuniverzalnija i najpogodnija za razne uzorke. Svaka faza se može modificirati ali osnovni kostur je isti. U prvoj se fazi dodaje digestivni pufer koji ima za zadatak lizirati stanične i jezgrene membrane i osloboditi genomsku DNK. Zatim se dodaju proteinaze koje će razgraditi stanične i DNK vezane proteine dalje oslobađajući DNK. Uzorak se potom centrifugira i tretira fenolom i kloroformom koji „obaraju“ proteine, masti i ostale nečistoće ostavljajući DNK. Precipitacija DNK se, ovisno o očekivanoj količini i kakvoći, može provesti naizmjeničnim ispiranjem 70%-nim i apsolutnim alkoholom. Drugi način je ispiranje DNK otopine kroz ultramembranu koja propušta tekuću fazu i zadržava DNK. Ta metoda je pogodna za manje količine DNK kao i degradirane uzorke ali zahtijeva posebne epruvete (Centrikon metoda). Općenito, unatoč mnogim modifikacijama, izdvajanje DNK organskim otapalima nije prikladno za uzorke s minimalnom količinom DNK. Za rane RFLP metode je bila potrebna visokomolekula RNK i DNK koja se ipak najbolje izdvajala organskim otapalima.

Najčešće uporabljene kemikalije koje razbijaju stanične membrane su natrijev dodecilsulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) i deterdžent TWEEN (polioksietilensorbitan) (PEĆINA-ŠLAUS, 2009). SDS je jaki ionski deterdžent koji uzrokuje potpuni gubitak funkcije membranskih proteina, denaturira DNK-ze ali ne i DNK, a ne smeta aktivnosti proteinaze K. TWEEN je neionska skupina deterdženata, često upotrebljavana u laboratorijskim uvjetima, te, kao i SDS, iritans. Uklanjanje proteina, lipida i ugljikohidrata se provodi fenolom i kloroformom nakon djelovanja proteinaze K. Fenol, u homogeniziranom i centrifugiranom tkivu, zarobi proteine između gornje vodene i donje fenolne faze. Kloroform djeluje slično kao i fenol te ga pomaže ukloniti iz uzorka. Glavni prigovor ovoj metodi je činjenica da su i fenol i kloroform otrovni i relativno opasni za ljude koji rade s njima. Proteinaza K je aktivna, serinska proteinaza široke specifičnosti koju proizvodi plijesan *Tritirachium album* var. *Limber*. Glavna pogodnost uporabe te proteinaze je što nije denaturirana SDS-om, a učinkovito odstranjuje DNK-ze. Integritet same molekule DNK, tijekom postupka izolacije, se čuva primjenom EDTA i Trisom (Tris-hidroksimetilaminometan). EDTA veže dvovalentne ione i tako inaktivira nukleaze, dok je Tris slaba organska baza koja održava pH oko 7,8. Nakon odstranjivanja svih nepotrebnih tvari, DNK je potrebno prenijeti u medij gdje može ostati sačuvana dulje vrijeme bez degradacije. DNK se mora najprije istaložiti, a zatim otopiti u puferu ili vodi. Apsolutni etanol uklanja hidratacijski omotač oko otopine, taloži molekulu DNK, a može se koristiti za njeno neograničeno čuvanje. 2-propanol se koristi u iste svrhe. NaCl, ovisno o koncentraciji, taloži proteine i čuva DNK.

SAM POSTUPAK (modifikacija protokola Sambrook i Russel, 2001.)

Određena masa tkiva (150-450 mg) stavlja se u sterilnu eppendorf epruveticu od 1,5 ml u koju je prije stavljen 1 ml pufera za lizu stanica. Zatim se dodaje 15 µl proteinaze K, te slijedi inkubacija na 37°C u vodenoj kupelji preko noći. Sadržaj epruvete se radi praktičnosti može podijeliti u dvije epruvete u koje se dodaje isti volumen fenola. Uzorci se lako protresu i stave miješati pomoću spore rotacijske miješalice 5-10 min. Slijedi centrifugiranje 10 min na 10 000 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Potom se pipetom odvoji gornja vodena faza, bez diranja proteinske i fenolne faze, u sterilnu epruvetu. Na dobiveni volumen vodene faze, dodaje se pola volumena kloroforma i fenola. Ponavlja se miješanje, centrifugiranje i izdvajanje vodene faze. Dodaje se jedan volumen kloroforma na izdvojeni volumen vodene faze, slijedi miješanje u rotacijskoj miješalici, centrifugiranje. Opet se izdvaja vodena faza i prenosi u zasebnu, sterilnu epruvetu. Na dani volumen se dodaje 2,5 volumena hladnog, apsolutnog etanola, sadržaj se

vorteksira, a DNK postaje vidljiva u obliku malog, paučastog, bijelog klupka. Uzorak se ostavlja preko noći na -20°C . Iduće jutro, uzorak se centrifugira na 14 000 okretaja/min, na 4°C kroz 20 min. Etanol se pažljivo otpipetira iznad zaostalog bijelog taloga koji se suši u termomikseru cca 15 min. Talog se, preko noći, otapa u TE puferu uz laganu trešnju i na sobnoj temperaturi. Prije razdijeljeni uzorci se spajaju u jednu epruvetu i s njima se dalje manipulira.

2018. godine je napravljena studija metode ekstrakcije DNK iz tvrdih tkiva za potrebe forenzičke analize (SAMSUWAN i sur., 2018.). Svinjski zubi i kosti su izabrani kao zamjena ljudskim i bili su izloženi raznim uvjetima; ostavljeni na otvorenom, zakopani u zemlju, zakopani u pijesak, potopljeni u vodu, potopljeni u morsku vodu, uronjeni u kaustičnu sodu i sumpornu kiselinu i paljeni gumom. DNK se izdvajala u raznim vremenskim uvjetima ovisno o spomenutim okolišnim uvjetima, npr. nakon jednog dana, tjedna, mjesec dana, 3-6 mjeseci nakon i godine dana. Nakon dogovorenog vremena uzorci su uzeti i usitnjeni čekićem, te pohranjeni na 50°C sa puferom za lizu (0.75 mol/l NaCl, 0.024 mol/l EDTA, pH 8.0), koji još sadrži 10% SDS i 20 mg/ml proteinaze K, tijekom noći. DNK je ekstrahirana standardnim fenol-kloroform protokolom, precipitirana etanolom, osušena na sobnoj temperaturi i resuspendirana u destiliranoj vodi. Koncentracija je mjerena NanoDrop 2000 spektrofotometrom dajući vrijednost 260/280 odnosa preko 1.8, što je pogodno za PCR. Izabrao se jedan jezgri i jedan mitohondrijski lokus za amplifikaciju. Ovisno o proteklom vremenu i dizajniranim okolišnim uvjetima, PCR je bio različito uspješan ali sama ekstrakcija iz zuba i kosti je bila uspješna.

Još jedna modifikacija ekstrakcije organskim otapalima je bila ponuđena za potrebe genomske analize klaoničkih svinjskih trupova. Uzorkovani su koža, mast, mozak, jetra i mišić. Duboko smrznuti (-20°C) usitnjeni uzorci su pomiješani sa ekstrakcijskom otopinom (50 mM Tris-HCL, pH8.0; 25 mM EDTA, 400 mM NaCl) uz dodatak SDS-a i proteinaze K. Nakon inkubacije, proteini i stanični debris su bili precipitirani dodatkom NaCl-a. SuperNKTantu se dodao gvanidin hidroklorid i amonijev acetat, i nakon blage trešnje kroz 90 min, DNK se istaložila dodatkom 100%-nog isopropilnog alkohola. Nastala DNK se peleta se osušila i nanovo otopila u TE puferu. Izdvojena DNK je bila visokomolekularna i time pogodna za amplifikaciju većih fragmenata (umnožene su dvije regije svinjskog hormona rasta radi ispitivanja integriteta dobivene DNK). Spektrofotometrijska mjerenja su se razlikovala ovisno o podrijetlu tkiva, mozak, jetra i bubreg su dali najčišću DNK, mišići sadržavaju više proteina koji smetaju ekstrakciji kao i netopljivost masnog tkiva u vodi, dok je koža stratificirana sa

tvrdim staničnim membranama i više fibrinoznog tkiva. Ovaj protokol je, prema autorima, brz, jednostavan i jeftin u smislu reagensa, te mu je glavna prednost što ne koristi fenol (BIASE i sur., 2002.).



Slika 1. Laboratorij za izdvajanje DNK i RNK (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

2.1.2. Metoda izoliranja (*salting-out DNK extraction*)

Miller i suradnici (MILLER i sur., 1988.) su osmislili metodu izoliranja s ciljem ekstrakcije DNK bez otrovnih organskih otapala. Prvenstveno se htio optimizirati korak deproteinacije i, unatoč nekim drugim razvijenim procedurama u to vrijeme, ovaj je postupak bio najbrži, najsigurniji i najjeftiniji. Uzorak, u ovom slučaju leukociti, je resuspendiran sa puferom za lizu koji sadrži Tris-HCL, NaCl i Na_2 ETDA. Lizat je zatim ostavljen preko noći, na 37°C uz 10% SDS i 0.5 ml proteinaze K. Nakon što je završila digestija, uzorku je dodan 1 ml saturirane otopine NaCl-a (6M) uz protresanje epruvete. Nakon centrifugiranja u trajanju od 15 min i pri 2500 rpm, peleta sa proteinima je zaostala na dnu, a supernatant sa DNK je odvojen u zasebnu tubicu i precipitiran apsolutnim alkoholom. Precipitirane DNK se pipetom

odvoji u treću epruvetu i otopi u TE puferu. Čistoća dobivene DNK je bila jednako dobra kao i kod izdvajanja fenolom i kloroformom i poslije uredno korištena za RFLP analize.

Danas postoje razne varijacije na ovu metodu, ovisno o uzorku, i primjenom drugih soli. Primjenom amonijeva acetata kao soli, izolirana je DNK iz formalinom fiksiranih parafinskih tkiva. Ona je bila jednake kvalitete i pogodna za PCR kao i uzorci izolirani fenolom-kloroformom i komercijalnim kompletima (RIVERO i sur., 2006.). Natrijev acetat je korišten kao sol pri izolaciji iz koštanih ostataka. Tražila se alternativna metoda fenol/kloroform izolaciji za potrebe izolacije iz starih koštanih ostatak, tj. u forenzičke svrhe. Korištene su svježi koštani uzorci, kosti stare 3 i 9 mjeseci, ljudskog podrijetla, ali i goveđe kosti. DNK je bila izolirana i dokazana PCR-om u više pokušaja nego pri ekstrakcijom organskim otapalima koja je služila kao kontrola (CATTANEO i sur., 1995.).

2.1.3. Metoda izdvajanja u gradijentima CsCl sa etidijevim bromidom

Genomska DNK može biti pročišćena centrifugiranjem kroz gradijent gustoće cezij klorida. Matthew Meselson, Franklin Stahl i Jerome Vinograd su razvili ovu metodu 1957.-e s ciljem razdvajanja čestica slične veličine samo na temelju njihove gustoće. Meselson i Stahl su razdvajanjem DNK kroz gradijent gustoće CsCl-a 1958 dokazali da se NDA umnožava semikonzervativnim načinom, što će se smatrati „najljepšim eksperimentom u biologiji“. Stanice se liziraju detergentom i potom precipitiraju alkoholom. Resuspendirana DNK se miješa sa cezij kloridom i etidij bromidom i centrifugira nekoliko sati. Tijekom centrifugiranja, molekule CsCl-a će disocirati i rasporediti u epruveti. Najveća gustoća Cs^+ iona će biti na dnu epruvetu, zatim u sredini i najmanje pri vrhu. Molekula DNK će se smjestiti u dijelu epruvetu gdje će, uslijed jednake gustoće, svoje i Cs^+ iona, „plutati“. Etidij bromid se interkalira sa molekulom DNK i čini je vidljivom pod ultraljubičastim svjetlom te omogućuje razlikovanje superuzvijene DNK i linearne DNK. To se postiže tako što etidij bromid smanjuje plutajuću gustoću linearne DNK koja bude vidljiva kao zasebna frakcija nakon centrifugiranja. Nakon ultracentrifugiranja, DNK se pokupi iz tubice i ekstrahira s izopropanolom kako bi se uklonio etidij bromid i precipitira etanolom.

Ova metoda je, osim kromosomske, pogodna za izolaciju raznih vrsta DNK, plazmidne, rDNK i mitohondrijske. Ona je osjetljiva i daje dobre količine čiste DNK ali je vremenski

zahtjevna, traži puno ljudskog rada, relativno skupa naspram drugih i nepogodna za automatsko ekstrahiranje. Koristi se ultracentrifuga koja se vrti pet puta brže od standardne centrifuge. (NASIR i sur., 2017.)

Plazmidi su dijelovi ekstrakromosomske DNK koje nalazimo u bakterijama. Sastoje se od dvostruko uvijene, cirkularne DNK, i nose gene za razne osobine poput rezistencije na antibiotike i faktora virulentnosti. Lako je manipulirati njima i stoga se koriste u kloniranju gena i drugim aplikacijama molekularne biologije. S vremenom su razvijene brojne tehnike izolacije plazmidne DNK, uključujući alkalnu lizu, korištenje laboratorijskog detergenta Triton X-100, i lizu kuhanjem (vrenjem), kao i izdvajanje gradijentom CsCl-a. Kako se razvijalo razumijevanje teorije centrifugacije, kao i novi uređaji, danas postoje optimizirane procedure za izdvajanje plazmidne DNK, dobre kvalitete i u mnogo manje vremena (NOLES, 2008.).

2.1.4. Izdvajanje uz pomoć cetil trimetil amonij bromida (CTAB)

CTAB metoda se prvenstveno koristi za izdvajanje DNK iz biljaka i njihovih dijelova, listova, sjemenki, zrna, i dr. Biljne stanice su utoliko zahtjevnije jer imaju staničnu stijenku građenu od celuloze te sadrže razne koncentracije drugih kemijskih spojeva kao što su polisaharidi, polifenoli, proteini i lipidi. Također se izdvaja DNK iz raznih uzoraka hrane i prehrambenih proizvoda. Što se tiče životinjskih uzoraka, zamijećena je kao jedna od pogodnih metoda za feces, uz nju još i gvanidin tiocijanat, magnetske kuglice i komercijalni kompleti namijenjeni za fekalni materijal (PRIMORAC, 2008.). CTAB ekstrakcijski pufer se sastoji od 2%-tnog cetil-trimetil-amonijeva bromida alkalnog pH, NaCl-a, EDTA, TRIS-a, polivinilpiridona i merkaptotetanola. Koncentracija pufera se može korigirati ovisno o uzorku. Svaka korištena kemikalija ima svoju funkciju kako su je opisali J. Heikrujam i suradnici (HEIKRUJAM, i sur., 2020.); CTAB je amfipatski deterdžent koji ima hidrofilnu glavu i hidrofobni rep. U otopini oblikuje micelle i zarobljuje lipide. Ovisno o ionskoj snazi otopine CTAB se različito ponaša. Kada je ona slabija, CTAB precipitira nukleinska kiseline i kiselinske polisaharide. Kod veće ionske jakosti CTAB se veže za neutralne polisaharide i stvarajući komplekse koji se kasnije odstranjuju kloroformom, te inhibira enzimatsku aktivnost. NaCl odstranjuje proteine vezane za DNK i drži ih u otopljenom stanju kako se ne bi precipitali sa DNK. Tris služi kao pufer i neutralizira nagle pomake pH kada se stanični

zid i membrana raspadnu i oslobode citoplazmu. B merkaptoetanol je snažni redukcijski agens koji odstranjuje tanine i druge polifenole i denaturira proteine slamanjem njihovih disulfidnih veza. Polivinilpiridon (PVP) također veže biljne polifenole prije nego li se oni vežu za DNK što ometa daljnje analize. Kloroform i fenol su nepolarna organska otapala u kojima će se otopiti lipidi i proteini. Oni, nakon centrifugiranja, sačinjavaju organsku fazu dok negativno nabijena DNK ostaje u vodenoj fazi. Kloroform je gušći od vode pa se faze jasno odvoje ali može stvarati tanak sloj pjene između faza. Izoamilni alkohol služi da spriječi emulgiranje i jasnije odvoji vodenu od organske faze, tj. DNK od staničnog debrisa. Genomska DNK se može tretirati ribonukleazama, a precipitira se alkoholom (izopropanol ili etanol) ili raznim solima (*salting-out*). Jednom precipitirana, ispiri se od ostalih korištenih reagensa i ponovno otapa u vodi ili Tris-EDTA otopini. Metoda je vremenski zahtjevna, koristi toksične kemikalije i potrebno je naknadno pročišćavanje od mogućih PCR inhibitora.

2.1.5. Izdvajanje DNK „Chelex“ 100 metodom

Chelex je kelacijski materijal Bio-Rad kompanije koji se koristi za pročišćavanje ostalih spojeva ionskom izmjenom. To je kopolimer stiren-divinbenzena sa skupinama iminodiacetne kieline. Njegov afinitet za vezanje dvovalentnih iona naspram jednovalentnih je 5000:1. Odlično veže bakar, željezo i druge teške metale. Chelex veže i magnezijeve ione koji su kofaktori nukleazama i, na taj način, pomaže očuvati DNK u uzorku koji se kuha sa smolom. Proizvodi se u nekoliko formi: Analytical Grade Chelex 100 Resin i Biotechnology Grade Chelex 100 Resin su visoko pročišćene i prilagođene za primjenu u analitičkim laboratorijskim metodama s ciljem što veće točnosti i ponovljivosti rezultata. Biotechnology Grade Chelex 100 Resin također ne smije imati više od 100 mikroorganizama u gramu smole. Također postoji i industrijska verzija Chelexa za, primjerice, izdvajanje metalnih iona iz otpadnih voda. P. Sean Walsh i suradnici su 1991. usporedili učinkovitost izdvajanja DNK uz pomoć organskih otapala i Chelexa iz uzorka sjemena i krvnih mrlja. DNK se potom umnožila PCR-om za određeni lokus kao dokaz dobro izdvojene DNK. Autori su ustanovili da je izdvajanje Chelexom jednako, ponekad i učinkovitije, kao i fenol-kloroform metodom. Također se smanjuje mogućnost unakrižne kontaminacije uslijed manje potrebnih koraka i premještanja uzorka iz epruvete u epruvetu. Ispostavilo se da Chelex smola, na neki način, štiti uzorke tijekom kuhanja jer uzorci kuhani samo u destiliranoj vodi se nisu umnožili PCR-om. P. Sean Walsh i sur.

(1991.) su ustanovili da uzorci krvnih mrlja izdvojeni Chelexom imaju manje inhibitora PCR-a od uzoraka izdvojenih fenol-kloroformom, možda zbog nekorištenja proteinaze K koja bi oslobodila hem i porfirinske komponente koji bi smetali umnažanju, a možda ih Chelex smola veže na sebe. Sperma, izvještavaju autori, ipak ne oslobađa DNA samo kuhanjem, nego zahtjeva tretiranje proteinazom K i DDT-om. Metoda je prvenstveno razvijena za izdvajanje DNK iz forenzičkih uzoraka i daljnje umnažanje PCR-om. Uzorci mogu biti puna krv, krvne i sjemene mrlje, kose, obrisak sluznice obraza, mlijeko... Dio dobivene DNK može ostati jednolančan, a uslijed visokih temperatura i alkalnosti, dolazi i do pucanja DNK molekule. Uzorci izolirani uz pomoć Chelexa su pogodni za daljnje obrade temeljene na PCR-u, nikako za RFLP. S obzirom da nedostaju neki koraci pročišćavanja izolirane DNK, moguća je prisutnost PCR inhibitora što joj je i glavni nedostatak. Utkarsha A. Singh i suradnici (1991.) su zaobišli ovaj problem modifikacijom protokola na način da su dodali amonijev acetat kako bi se proteini bolje precipitirali, kao i mješavinu natrijeva acetata i isopropanola kako bi DNK bila vidljivija. Njihov izmijenjeni protokol se pokazao boljim, čak i kod minimalnih uzoraka tkiva i krvi, sa većom čistoćom i prinosom genomske DNK iz iste mase uzorka (SINGH i sur., 2018.).

Izolacija DNK od pera kokoši Chelex metodom (RAHMAN ERNKNTO i sur. 2018.)

Perje je dodatna epidermalna struktura, sastavljena od keratina, i formira vanjski pokrov ptice. Često je problematično izvaditi krv na manjim pticama i pilićima, naročito kad je potrebna veća količina uzoraka. Izolacija DNK u Chelex metodom u ovoj studiji se izvela na sljedeći način; komadić baze pera se stavio u 1.5ml eppendorf epruvetu. Dodani su 200 µl 5% otopine chelexa, 2 µl proteinaze K i 18 µl 0.05 M DTT (ditiotritol). Uzorak je inkubiran 4h na 56°C i vorteksiran svakih 30 min. Potom je stavljen u kipuću vodu na 100°C tijekom 8 min., te homegeniziran 30 sec. Zatim se uzorak centrifugirao na 13 000 okretaja/min tijekom 3 min i supeRNKtant od 200 µl se preselio u novu epruvetu.

Studija je bila rađena s ciljem usporedbe čistoće i koncentracije DNK dobivene Chelex i fenol/kloroform metodom. Uzorak dobiven Chelex metodom je bio u većoj koncentraciji ali manje čistoće nego uzorak dobiven organskim otapalima. I jedan i drugi način su dali dovoljno kvalitetne uzorke za umnažanje PCR-om. Dokazano je da je izolacija Chelexom dovoljno učinkovita za izolaciju DNK iz pera, ali znatno praktičnija.

2.1.6. Ekstrakcija nukleinskih kiselina solidnom fazom

Izolacija solidnom fazom je jedna od najefikasnijih metoda na tržištu. Temelji se na stacionarnoj i tekućoj fazi koje razdvajaju analite ovisno o njihovim ionskim, hidrofobnim i polarnim svojstvima. Koriste se razni adsorbenti ovisno o tvari koja se nastoji izdvojiti. Za nukleinske kiseline se koriste silikonske matrice, staklene čestice, dijatomejska zemlja, magnetske kuglice, celuloza i razni materijali za anionsku izmjenu.

Silikon ima visok afinitet za vezanje DNK pod uvjetima visoke lužnatosti i koncentracije soli dok se ostale stanične komponente isperu. On je prekriven pozitivnim ionima, a molekula DNK je, zbog svojih fosfatnih grupa, negativna. DNK se ispiru iz silikonske matrice sa hipoosmotskim otopinama ili puferima, npr. Tris-EDTA, te dalje koristi. Razvijene su brojne modifikacije za izolaciju RNK kao i DNK. Izdvajanje na silika gelu daje dobre količine čiste DNK, jednostavno je za izvesti, ali sitniji fragmenti DNK ostanu vezani za silikon i nedostupni za kasnije pretrage. *Silica (mini) spin column* je epruveta sa unaprijed ugrađenom silikonskom membranom i sastavni dio mnogih komercijalnih kompleta za izolaciju nukleinskih kiselina.

Naprimjer, E.Z.N.A.® Tissue DNK Kit se koristi *silica mini spin* epruvetama i omogućuje izdvajanje iz smrznutih i svježih životinjskih stanica i tkiva, pune krvi, obriska sluznice usne šupljine, mišjih repova ali i rogova. Ovaj je komplet korišten za ekstrakciju DNK iz smrznutih samljevenih deset vrsta iz porodice jelena i šupljorožaca, između ostalih, sajga antilope, sika jelena, mongolske gazele i azijskog vodenog bizona. Dobivena DNK je dalje umnožena PCR-om i nastali produkti su sekvencionirani radi usporedbe intra- i interspecijske varijabilnosti. (DAN YAN i sur., 2013). *NucleoSpin Food* (Macherey-Nagel) i *JetQuick Tissue DNA Spin Kit* (*ThermoFisher Scientific*) su komercijalni kompleti koji su dali najbolji prinos, kvalitetu i uporabljivost DNK iz uzoraka nekih namirnica i životinjske hrane. Testirani su sirovo pileće meso, kobasice, mesni doručak, šunka, konzervirana pseća hrana, pašteta, granulirana pseća hrana i kokošje brašno (NESVADOBOVÁ i sur., 2010.).

Staklene čestice u prahu, kao stacionarna RNK faza u kromatografiji, i kao mikrokuglice, su također korištene za ekstrakciju DNK. Kaootropne soli se koriste za oslobađanje nukleinskih kiselina iz stanice, te se one vežu za obično, kremenito ili borosilikatno staklo.

Dijatomejska zemlja se sastoji od 80-90% silikona, te ostalo od aluminijske i hematita. Procedura je slična kao i sa silikonskom matricom, DNK se veže u prisustvu kaootropnih soli i kasnije ispire blagim puferima. Navodi se manja potreba za pripremom uzorka, dobro izdvajanje plazmidne, jednolančane i dvolančane DNK ali i viša cijena postupka. (NASIR i sur., 2017.)

Tehnologija izdvajanja nukleinskih kiselina magnetskim kuglicama je jedna od najbrže razvijajućih danas (NASIR i sur., 2017.). Pogodna je za genomsku, mitohondrijsku i plazmidnu DNK. Magnetske kuglice mogu biti presvučene silikomom, raznim funkcionalnim grupama kao i oligonukleotidima koji onda hibridiziraju sa ciljanom molekulom. Jednom kad se uzorak pomiješa sa odgovarajućim magnetskim kuglicama u odgovarajućem puferu, nukleinske kiseline vezane na magnetske kuglice se izvlače iz epruvete elektromagnetskom pipetom. Nije potrebna naročito sofisticirana oprema, moguća je automatizacija postupka i obrada velikog broja uzorka, a pogodna je za izdvajanje DNK iz raznih uzoraka biološkog podrijetla (krv, homogenati tkiva, kultivacijskih medija, vode i dr.). Svojstva kuglica se mogu prilagoditi pa je izolacija moguća iz viskoznih otopina, a ni mali volumen uzorka nije problem. Nema potrebe za centrifugiranjem (koristi se rotacija) pa ne dolazi do eventualnog oštećenja nukleinskih kiselina. Razne tvrtke imaju u ponudi specijalizirane kitove za izdvajanje pomoću magnetskih kuglica. Koriste se automatizirani uređaji sa magnetskim pipetama u koje se umeću patrone s više ili manje bazenčića ovisno o količini uzoraka koji se obrađuju odjedanput. Primjer takvog uređaja je Maxwell® 16 System od tvrtke Promega (Madison, Wisconsin).

Ekstrakcija nukleinskih kiselina anionskim smolama se temelji na primjeni raznih umjetnih polimera, „smola“, koje svojim nabojem privlače nukleinske kiseline. One dolaze u obliku sitnih kuglica i, kao takve, imaju veliku površinu vezanja. Smola veže nukleinske kiseline na sebe, a sve ostalo se ispire s njene površine. Kada je potrebno odvojiti nukleinske kiseline, koriste se razne koncentracije soli i pH. Dobije se vrlo čista DNK, a polimer se može ponovno koristiti. Nukleinske kiseline je potrebno desalinizirati prije daljnje uporabe što je, uvjetno rečeno, loša strana ovih metoda. Tvrtka Qiagen nudi također kitove za izolaciju nukleinskih kiselina sa vlastitim smolama.

Još jedan interesantan primjer primjene solidne baze je ekstrakcija na celuloznom matriksu. Celuloza je polimer glukoze i visoko hidrosilirana sa dovoljnim polaritetom da, pod

pravim kemijskim uvjetima, veže nukleinske kiseline. To je tehnologija na kojoj se baziraju FTA kartice.

2.1.7. Izdvajanje DNK Qiagen metodom

Qiagen je njemačka tvrtka specijalizirana za izradu alata i metoda molekularne dijagnostike, te je vodeći pružatelj inovativnih tehnologija uzorkovanja i ispitivanja koje omogućuju izolaciju i detekciju sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. DNK ekstrakcijski kompleti tvrtke Qiagen su među najjednostavnijim i najpouzdanijih kompleta. Postoji više varijanti prilagođenih raznim vrstama uzoraka. Postupak se svodi na osnovne faze digestije uz prisutnost proteinaze K i pročišćavanje uzorka u posebnim kolonama za koje je vezana silika membrana (*spin columns*) i ispiranje tako vezane DNK u druge tubice. DNK se veže za pozitivno nabijenu siliku što Qiagen komplete svrstava u metode izdvajanja na čvrstoj fazi. Uzorci koji dolaze u obzir su puna krv, krvne mrlje, dlake, opušci, sperma, kosti, biljne stanice, stanične kulture, razna meka tkiva, histološki preparati i dr. Kompleti za životinjska tkiva omogućuju izdvajanje iz mišjeg i štakorskog repa, svinjskog uha, konjske dlake, riblje peraje, izdvajanje mikrobne DNK iz uzoraka životinjskog podrijetla.

Primjer protokola za izdvajanje DNK iz uzoraka životinjskog podrijetla, uključujući miše i štakorske repove koristeći DNeasy® Blood and Tissue Kit:

Za štakora se uzme dio repa od 0.4-0.6cm dužine, za miša 2 takva dijela, usitni i stavi u 1.5 ml mikrocentrifugalnu tubu. Dodaje se 180 µl ALT pufera (dolazi u kitu). Dodaje se 20 µl proteinaze K, vorteksira i inkubira na 56° dok se potpuno ne razgradi uz povremeno miješanje. Za repove glodavaca je potrebno oko 6-8h. Uzorak može biti viskozozan ali ne smije biti želatinozan. Vorteksira se opet kroz 15-tak sekundi i dodaje se 200 µl AL pufera, vorteksira, doda se 200 µl apsolutnog etanola i vorteksira do homogene smjese. Ona se potom pipetira u DNeasy Mini Spin columnne smještene u kolekcijske tubice zapremnine 2 ml. Slijedi centrifugiranje na 8000 rpm i odbacivanje kolekcijskih tubica sa njihovim sadržajem. DNeasy Mini Spin column se premještaju u 2 nove kolekcijske epruvete, dodaje se 500 µl AW1 pufera koji dolazi s kitom, te se uzorak opet centrifugira i odbacuju se kolekcijske tube. Spin kolumne se premještaju u nove kolekcijske tube i dodaje se AW2 pufer. Kolumne se centrifugiraju dok se membrana na njima ne osuši od etanola i ne oteče višak pufera. Dalje se kolumne smještaju

u čiste mikrocentrifugalne tube i na njih se pipetira 200 µl AE pufera. Nakon kratke inkubacije od 1 minute i isto tako dugog centrifugiranja, u mikrocentrifugalnoj tubici ostaje eluat DNK spreman za daljnje analize.

2.1.8. FTA tehnologija

FTA (*Flinders technology associates*) kartica je kemijski tretirani, celulozni papir koji rupturira stanične membrane, denaturira proteine i štiti DNK. Jednostavni su za korištenje, pohranu i slanje na velike udaljenosti. Kartice mogu, s uzorkom, godinama stajati na sobnoj temperaturi. Prigodne su za skoro svaki tip stanica, a uzorci uključuju krv, stanične kulture, alantoišnu tekućinu, strugotine i otiske tkiva, briseve sluznica i mnogo drugih. Jednom kada je uzorak uzet, indikator u kartici promjeni boju. Tako dobivena DNK se može koristiti u daljnjim analizama već za pola sata. Nema potrebe za kvantifikacijom i postupak se može automatizirati. Zbog jednostavnosti i brzine korištenja su jako popularne i primjenjuju se u forenzici, transfuzijskoj medicini, screeningu palzmida, testiranju hrane, identifikaciji životinja, genomskim istraživanjima, determinaciji uzročnika bolesti i dr.

Postupak za uzimanje otiska tkiva

Organ koji se uzorkuje se zareže i, iz unutrašnjosti, se odreže komadić tkiva. Tkivo se uhvati pincetom i čvrsto pritisne i trlja na aplikacijski krug kartice. Napravljeni otisak se ostavi 30-tak min na sobnoj temperaturi da se osuši. Za to se vrijeme kartica mora čuvati podalje od vlage, vrućine i direktnog sunčevog svjetla.

Kartice na sebi imaju unaprijed označene i perforirane krugove na koje se uzima uzorak. Oni se poslije samo ispuknu iz kartice.

2.2. Kvantificiranje DNK

Upotrebljivost dobivene DNK uvelike ovisi o njenoj količini i kakvoći. Uzorci mogu biti kontaminirani drugom DNK kao što je bakterijska, te sadržavaju razne tvari koje koče daljnje postupke, prvenstveno PCR. Količina DNK također mora biti optimalna jer premalo,

ali i previše, DNK onemogućuju pojedine postupke. Kvantificiranje DNK se može provesti spektrofotometrijskom analizom, metodom „Yield“ gela ili produkt gela, hibridizacijskom (*slot-blot*) metodom i QRT-PCR kvantifikacijom.

2.2.1. Spektrofotometrija

Molekularna građa nukleinskih kiselina određuje njihovu sposobnost apsorpcije svjetlosti određene valne duljine. DNK i RNK iskazuju maksimalnu apsorpciju kod svjetlosti valne duljine 260 nm, te minimalnu na 230 nm (PEĆINA-ŠLAUS i sur., 2009.). Ova metoda je neselektivna jer mjeri ukupno prisutnu DNK i RNK bez obzira na njeno podrijetlo, i kao takva, je neprikladna za forenzičke analize. Također je dosta osjetljiva na razne kontaminante zbog kojih može precijeniti dobivene nukleinske kiseline.

Neki uzorci sa skromnijim sadržajem DNK, kao što su cerebrospinalna tekućina, FNA, urin, FFPE tkivo, budu neprecizno analizirani. Općenito, spektrofotometrija je jednostavna, ne zahtijeva pripremanje uzorka prije početka, pogodna je za puno daljnjih analiza. Osim dobivene koncentracije, može se odrediti i čistoća uzorka. U spektrofotometru uzorak biva izložen UV svjetlosti duljine 260 nm, a fotodetektor s druge strane mjeri svjetlost koja je prošla kroz uzorak (Slika 2.). Što manje svjetlosti detektor izmjeri, odnosno, što više svjetlosti uzorak apsorbira, to je veća koncentracija nukleinskih kiselina. Beer-Lambertov zakon opisuje ovisnost energije apsorbirane pri određenoj valnoj duljini kao funkciju koncentracije apsorbirajuće molekule. Zakon glasi: $I = I_0^{-\varepsilon dc}$ gdje je I intenzitet propuštenog svjetla, I_0 intenzitet upadnog svjetla, ε molarni ekstinkcijski koeficijent, d duljina puta zrake svjetlosti i c koncentracija apsorbirajuće molekule. Apsorbancija pri 260 nm jednaka 1,0, odgovara približnoj koncentraciji DNK od 50 $\mu\text{g/ml}$, na temelju čega se može indirektno izračunati koncentracija DNK uzorka.

Postupak

U kvarcne kivete volumena 2 ml, stavit će se 1 ml kvarcne vode (QH_2O) i 10 μl uzorka DNK otopljenog u TE puferu. Time dobivamo razrjeđenje od 1:100. razrjeđenje ovisi o volumenu kivete i o volumenu DNK koji se može izdvojiti za ovo mjerenje. Sam uređaj se

baždari kvarcnom vodom prije samog mjerenja. Ako znamo da otopina DNK koncentracije od 50 µg/ml odgovara apsorbanciji od 1,0, onda se računa:

$$c(\text{uzorak}) = ((50 \mu\text{g/ml} * A_{260}(\text{uzorak})) / 1,0) * 100$$

Kada se uspoređuju dva uzorka dobivena dvjema različitim metodama, važno je izračunati koncentraciju DNK dobivenu po 1 mg upotrijebljenog tkiva, dakle:

$$c(\text{DNK})/\text{mg tkiva} = c(\text{DNK})/\text{m (uporabljenog tkiva) mg}$$



Slika 2. Spektrofotometar (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

Procjena čistoće uzorka

Uzorak je utoliko čišći što je manje prisutno drugih molekula i makromolekula kao što su proteini, ostaci fenola ugljikohidrati i polifenoli. Mjeri se apsorbancija na četiri valne duljine; 230 nm – apsorpcijski maksimum peptidnih veza, fenola i dr. aromata, EDTA, 260 nm – aps. max. nukleinskih kiselina, 280 – apsorpcija aromatskih aminokiselina i drugih spojeva s aromatskim prstenom, 320 nm – proteini i nukleinske kiseline ne apsorbiraju tu valnu duljinu. Omjer A_{260}/A_{280} je uobičajan način procjene proteinske kontaminacije. Otopina mora

imati manje od 1,8 da bi se smatralo a sadrži čistu DNK. Omjer A_{230}/A_{260} , osim na proteinsko, upućuje i na zagađenje polifenolima i ugljikohidratima. Vrijednost apsorbancije na 320 nm se koristi za korekciju ostalih vrijednosti koja je potrebna zbog turbiditeta nekih uzoraka.

2.2.2. Elektroforeza kroz agarozni gel

Ovo nije ni najbrža ni najpreciznija metoda, ali osim količine DNK, može odrediti njenu očuvanost i veličinu. Zbog svog fosfatnog kostura, molekula DNK je negativno nabijena. To će rezultirati njenim pomicanjem prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi, kada se izloži električnom polju. Funkcija agaroznog gela je da se ponaša kao mreža kroz koju će se teže molekule sporije kretati i zaostajati. Agarozni gel se najčešće priprema u koncentracijama od 0.7%-2%. Manja koncentracija rezultira većim porama u gelu kada očekujemo veće fragmente u uzorku i obrnuto. DNK će vizualizira bojama koje se mogu dodati odmah u gel ili se on naknadno oboji sa, npr., metilenskim modrilom, etidijevim bromidom. Kao kontrola se dodaje uzorak DNK poznate koncentracije čije će se molekule raspodijeliti u trake poznate koncentracije i poslužiti za usporedbu našeg uzorka (Slika 3., Slika 4.).

Ovaj način kvantificiranja je najpogodniji za fragmente DNK, npr. PCR produkte. Za razliku od spektrofotometrije, ova metoda ne otkriva kontaminaciju proteinima i kaotropnim solima, ali, može otkriti kontaminaciju drugom RNK i DNK. Ona se prezentira prisutnošću drugih traka i „repova“.



Slika 3. Laboratorijska oprema za DNK elektroforezu (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić



Slika 4. Trasiluminator za vizualizaciju i slikanje produkata DNK elektroforeze u gelu (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

2.2.3. Kapilarna elektroforeza

Kvantificiranje DNK kapilarnom elektroforezom koristi isti fizikalni princip kao i gel-elektroforeza ali na mnogo manjoj razini i proces je automatiziran. Druge prednosti su brzina postupka, rezolucija, osjetljivost i kompjuterizirana analiza podataka. Postupak traje nekoliko minuta, uzorci su nanogramske veličine i moguće je razdvojiti fragmente koji se razlikuju u jednom nukleotidu dužine. Razdvajanje ciljnog analita se odvija pod elektromagnetskim

poljem u cjevčica čiji je promjer manji od milimetra i u mikro- i nanofluidnim kanalima. Cjevčica je ispunjena sa tekućinom ili gelom i uronjena, sa svakim svojim krajem, u otopinu pufera. Koristi se viša voltaža (10-30 kV) jer tanki zidovi kapilara omogućuju bolje rasipanje suvišne topline naspram bloka gela u gel-elektroforezi koji se može i otopiti uslijed prevelike voltaže. Same kapilare su obično silikonske i presvučene iznutra sa inertnim slojem koji ne reagira sa nukleinskim kiselinama, a izvana sa poliimidom koji daje fleksibilnost i čvrstoću tankoj kapilari. Jedan segment cjevčice je namjerno ostavljen nezaštićen kako bi poslužio kao optički prozor fluorescentnom ili UV detektoru koji očitavaju rezultat. UV detektor koristi svjetlo valne duljine 260 nm sa ili bez etidijeva bromida. Dodavanje interkalirajućih boja, poput derivata cijamina i rodamina, osjetljivost se povećava za čak 2 reda veličine. Nastali „bandovi“ također budu bolje (oštrije) vidljivi. Uzorci se unose u kapilaru elektrokinetski, injekcijski i pod tlakom. Kapilarna elektroforeza se prvenstveno primjenjuje u analizi sintetskih oligonukleotida, zatim u analizi PCR produkata, genotipizaciji, forenzičkoj analizi bioloških tragova kao i u metodama sekvencioniranja. Sekvenciranje prve generacije, odnosno metoda po Sangeru, temelji se na kontinuiranom zaustavljanju replikacije korištenjem fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (ddNTP-a). Sekvenca DNK određuje se elektroforetskim razrduživanjem visoke razlučivosti nastale smjese i određivanjem fluorescentne boje laserom. Metoda zahtjeva puno vremena i prostora te kapilarnu cijev ili gel za određivanje duljine DNK (VLAHOVIĆ i sur., 2020.).

2.2.4. Hibridizacijska (*slot-blot*) metoda

Dot ili Slot „mrljanje“ (*blotting*) i posljedično hibridiziranje sa oligonukleotidnim sondama je razvijeno 1979 god. od strane Kafatosa i suradnika. Tehnika se koristi za procjenu relativne količine ciljne nukleinske kiseline u seriji uzoraka. Mješavina nukleinskih kiselina se prenese i imobilizira na nitroceluloznu ili najlonsku membranu. Dodaje se DNK sonda koja će se vezati sa komplementarnim dijelom u uzorku. Rezultati se očitavaju kemiluminiscencijskom ili kolorimetrijskom metodom i dobivena koncentracije se uspoređuje sa pozitivnom kontrolom. Hibridizacijom je moguće detektirati vrlo male količine DNK ali sam postupak je vrlo složen, vremenski zahtjevan i ovisan o sposobnosti analitičara koji ga izvodi.

2.2.5. Fluorometrija

Još poznata kao i spektrofluorimetrija, je još jedan tip elektromagnetske spektroskopije koja analizira svjetlo emitirano od strane fluorogenskih molekula zvanih fluorofore. Primjena fluorescentnih boja omogućuje kvantifikaciju DNK s većom osjetljivošću nego samo kvantifikacija apsorbancijom. Molekule boja koje se koriste su specijalno dizajnirane da se vežu za određeni tip nukleinskih kiselina. Time se ujedno i smanjuje utjecaj kontaminanata. Zbog specifičnog vezanja boje i tražene nukleinske kiseline, fluorometrija rezultira visokom specifičnošću, točnošću i niskim pozadinskim signalom zbog drugih molekula, i, kao takva, je idealna za kvantifikaciju uzoraka sa malom količinom nukleinskih kiselina. Uređaji koji se koriste su fotometar mikroploča (*plate reader*) ili fluorometar. Kit se izabire ovisno o željenoj nukleinskoj kiselini, očekivanoj koncentraciji, tipu i volumenu uzorka. Potrebna je unaprijed pripremljena standardna krivulja od serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije. Fluorimetrija je preciznija od spektrofotometrije ali skuplja.

2.2.6. RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*)

Real time PCR, ili kvantitativni PCR (qPCR), je tehnika u molekularnoj biologiji temeljena na PCR-u. Njezina vrijednost je u tome što omogućuje vizualizaciju i mjerenje PCR proizvoda dok nastaju. RT-PCR može biti kvantitativan i polukvantitativan (ispod ili iznad određene količine DNK). Dva su osnovna načina detekcije produkata umnažanja; nespecifične fluorescentne boje koje se ugrađuju u dvostruku DNK kako ona nastaje, te DNK sonde specifične za određenu ciljnu sekvencu i označene bojom koja omogućuje detekciju tek nakon hibridizacije sa ciljnom sekvencom. qPCR može kvantificirati točno određeni dio tražene vrste nukleinskih kiselina, čak i u prisutnosti uobičajnih kontaminanata, drugih nukleinskih kiselina, početnica i slobodnih nukleotida. Umnožit će se, a time i očitati, samo dijelovi uzorka koji se mogu umnožiti. To znači da se raspadnute i degradirane nukleinske kiseline koje se ni u daljnjim analizama ne bi umnožile, neće pridonijeti konačnoj kvantifikaciji uzorka. Nakon svakog ciklusa amplifikacije uređaj mjeri nastalu fluorescenciju zbog čega se ta metoda i naziva PCR u stvarnom vremenu (*real time*).



Slika 5. Laboratorij za pripremu PCR reakcije, pohranu kemikalija i PCR produkata te pohranjivanje i dokumentiranje gelova (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Izvor: dr. sc. Snježana Ćurković

qPCR ima veliku vrijednost u mjerenju genske ekspresije pojedinih tkiva u raznim razvojnim fazama. Genska ekspresija nekog gena je mjerljiva brojem mRNK koje nastanu transkripcijom. Te mRNK se reverznom transkriptazom prevedu u komplementarne DNK čija se amplifikacija onda može izmjeriti. Povećanje ekspresije gena koji se proučava se uspoređi sa ekspresijom nekog gena koja je uvijek ista (*house-keeping genes*). Pri uporabi komercijalnih kompleta za identifikaciju jedinke/vrste preporučljivo je napraviti kvantitativnu analizu izolata DNK. Ispad alela i nejednakost alela uočeni su kada je početna količina DNK bila manja od 50 pg, no i prevelika količina DNK može stvarati probleme pri analizi. Najčešće se upotrebljava TaqMan® proba za MC1R gen (Melanocortin-1 Receptor, kodiran jezgrinim genomom), a druga za regiju SINE (*short interspersed element*, dio mtDNK) uz SYBR® Green 1 boju. Kvantifikacija je potrebna radi optimizacije uvjeta lančane reakcije polimerazom, multiplex PCR-a i stoga što komercijalni kompleti najbolje funkcioniraju u uskom rasponu koncentracije DNK (Slika 5.).



Slika 6. PCR uređaj u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Izvor: doc. dr. sc. Mirela Pavić

2.3. Umnažanje i daljnje analize

2.3.1. Lančana reakcija polimerazom

Polazna količina DNK je dugo bila ograničavajući čimbenik u analizi DNK. Osnovne odrednice PCR-a utemeljene su 1985 godine od strane Kary Banksa Mullisa i njegovih suradnika, izazvavši revoluciju u molekularnoj biologiji i drugdje. Osnovne postavke na kojima se zasniva PCR su: nativna molekula DNK je dvostruki heliks koji se sastoji od 2 antiparalelna polinekleotidna lanca: nukleotidi jednog lanca međusobno su povezani kovalentnom vezom između deoksiriboze jednog nukleotida i fosfatne skupine susjednog nukleotida, a vodikove veze koje održavaju 2 polinukleotidna lanca zajedno uvijek se formiraju između komplementarnih baza, adenin-timin i gvanin-citozin. Vodikove veze su slabe i raspadaju se tijekom zagrijavanja dok kovalentne ostaju očuvane. Hlađenjem se ponovno uspostavljaju vodikove veze.

Osnovni model PCR-a se sastoji od tri koraka: denaturacija (razdvajanje polinukleotidnih lanaca uvjetovano visokom temperaturom od 95°C), hibridizacije (povezivanje umjetno sintetiziranih i fluorescentno označenih početnica koje lociraju mjesta koja će biti umnožena) i produljivanje lanaca (vezanje komplementarnih baza na slobodna mjesta denaturirane matrice pomoću DNK-početnica i Taq polimeraze) (Tablica 1.). Dakle, za

osnovnu PCR reakciju potrebne su početnice (*primers*), slobodni deoksinukleotidni trifosfati (dNTPs), puferska otopina koja osigurava optimalni pH, DNK polimeraza (najčešće Taq polimeraza), bivalentni kationi (obično magnezijevi i manganovi), i, naravno, početni uzorak koji nastojimo umnožiti (Tablica 2.). Teoretski, od jedne kopije DNK se može, kroz 32 ciklusa umnažanja, dobiti $1,07 \times 10^9$ kopija. PCR-om se, dakle, umnaža (amplificira) određeni ulomak DNK i proizvode milijarde njegovih potpuno istovjetnih kopija.

1. faza Aktivacija polimeraze	95°C 2 min.
2. faza Razdvajanje lanaca	94°C 30 sek.
3. faza Sparivanje početnica	60°C 30 sek.
4. faza Produljivanje	72°C 30 sek.
5. faza Konačno produljivanje	72°C 10 min.
Temperatura čuvanja	4°C

Tablica 1. Primjer PCR protokola od 35 ciklusa u GeneAmp PCR System 9 700

Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

PCR je relativno jednostavan za primjenu, brz i visoko osjetljiv. U odnosu na RFLP potrebna je manja količina DNK, brža je, ne koriste se radioaktivni izotopi (PRIMORAC i sur., 2008.). Kao nedostaci navode se veća sklonost kontaminaciji, i drugo, mnogi PCR-om analizirani lokusi, poglavito STR-molekularni biljezi, imaju manje alela nego minisatelitski VNTR lokusi koji su analizirani RFLP-om. Također je potrebno prethodno poznavanje

sekvence koja se nastoji umnožiti kako bi se proizvele početnice koje će se vezati na ciljna mjesta oba DNK lanca i omogućiti polimerizaciju i daljnje umnažanje nastalih početnica-matrice hibrida.

Početnica/ primer	Slijed nukleotida/sequence (5' - 3')
Zajednička nivoDNK/forward početnica SIM (38 n)	GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA
Piletina (C) (27 n)	AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG
Svinjetina (P) (27 n)	GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA
Janjetina (S) (26 n)	CTATGAATGCTGTGGCTATTGTCGCA

Tablica 2. Primjer početnica, vrsno specifične (*species-specific*) početnice za umnažanje citokrom b gena (Cyt b gene) mitohondrijske DNK u svrhu utvrđivanje porijekla mesa peradi i svinja. Izvor: dr. sc. Snježana Ćurković

Danas su razvijene razne varijante PCR-a, a među poznatijima su qPCR (kvantitativni PCR) kojim se u stvarnom vremenu mjeri PCR produkte kako nastaju pomoću fluorescentno označenih hibridizacijskih sonda, RT-PCR koji, uz pomoć reverzne transkriptaze, prevodi RNK u cDNK koja se onda dalje umnaža, te Multiplex-PCR za umnažanje više ciljanih sekvenci uz pomoć više setova početnica. Još postoje asimetrični PCR, alel specifični PCR, konvekcijski PCR, digitalni PCR, hot-start PCR i dr. Za reakciju su potrebne DNK početnice, sintetički dizajnirani oligonukleotidi koji se vežu na ciljani dio uzorka, njegov paralelni i anitiparalelni kraj, i omogućuju polimerazi vezanje i daljnju elongaciju. Koristi se taq polimeraza, termostabilni enzim izoliran iz bakterije *Thermus aquaticus*, kao i smjesa slobodnih nukleotida koji će se vezati na novonastajući lanac. Uređaj za PCR, koji se još naziva i termocikler, omogućuje naglo zagrijavanje i hlađenje PCR smjese kroz unaprijed programirane korake, te daje izvor svjetla određenih valnih duljina koje izazivaju fluorescenciju (Slika 7.).

Primjena

PCR omogućuje umnažanje ciljanog fragmenta DNK iz genomske DNK koji će se dalje koristiti kao hibridizacijske sonde u northern i southern blottingu i DNK kloniranju. Primjenjuje se u dijagnozi genetskih bolesti, tipiziranju tkiva pri transplataciji, ranoj dijagnostici malignih bolesti, brzom i specifičnoj dijagnostici zaraznih bolesti, naročito onima uzrokovanim spororastućim uzročnicima. U forenzici, omogućuje točno povezivanje osumnjičenika s mjestom zločina, oslobađanje krivo optuženih iz ranijih slučajeva i brzu eliminaciju puno potencijalnih osumnjičenika. Životinjska DNK služi kao dokaz kada je životinja svjedok (povezivanje osumnjičenog i žrtve ili osumnjičenog i mjesta zločina), žrtva ili počinitelj (napad na čovjeka) (PRIMORAC i sur., 2008.). Filogenetska istraživanja potpomognuta PCR-om uključuju analizu neandertalske DNK iz pronađenih kostiju, DNK iz tkiva mamuta i mozga mumija. Još jedna uobičajena primjena PCR-a omogućuje procjenu genske ekspresije pojedinih tkiva. Moguće je također ciljano kreirati mutacije gena kako bi se proučavala funkcija proteina.



Slika 7. PCR kabinet i PCR uređaj (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Izvor: izv. prof. dr. sc. Daniel Špoljarić

2.3.2. Polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) je tehnika molekularne biologije koja koristi varijacije u homolognoj DNK, tj. polimorfizme, s ciljem određivanja individue, populacije ili vrste. DNK uzorka se cijepa restrikcijskim enzimima koji imaju razna ciljna mjesta, što rezultira nastankom puno manjih ulomaka koji se vizualiziraju gel elektroforezom, ili pomoću kemiluminiscentnih i radioaktivnih sonda. Korišteni restrikcijski enzimi su bakterijskog podrijetla i prepoznaju mjesta gdje se javlja specifična kratka sekvenca baza. Pomoću RFLP-a se proučavaju dvije vrste polimorfizama, promjene koje uključuju pojedinačne baze i minisatelitski VNTR (*variable number tandem repeats*) lokusi. Ti se lokusi razlikuju po duljini zbog različita broja ponavljajućih DNK sljedova na pojedinom lokusu. Postupak je danas velikim dijelom zamijenjen praktičnijim i bržim PCR-om.

Također je moguće i produkte PCR-a naknadno obraditi restrikcijskim enzimima u postupku poznatom kao polimorfizam duljine fragmenata terminalne restrikcije. Zahtijeva veliku količinu DNK koja mora biti što očuvanija, a nedostatak je i što je postupak dugotrajan, zahtjevan i, ponekad, se koriste radioaktivni materijali. Cijeli proces uključuje ekstrakciju DNK, fragmentaciju endonukleazama, odvajanje fragmenata elektroforezom, prijenos na najlonsku membranu putem „Southern blotting“ metode, hibridizacija između specifičnih lokusa radioaktivno označenim probama, ispiranje i autoradiografiju, te može potrajati i do mjesec dana. RFLP je bio prva tehnika DNK profiliranja dovoljno jeftina za masovnu primjenu. Bila je važan alat u mapiranju genoma, lokalizaciji gena kod genetskih poremećaja, procjene rizika pojave genetskih bolesti i testiranja roditeljstva.

U novije vrijeme se primjenjuje u sprezi sa PCR-om kako bi se poblizje odredio ciljni segment DNK, što se naziva PCR-RFLP. 2006. god., u Italiji se radilo istraživanje populacije kuna zlatica, kuna bjelica, tvorova i lisica iz uzoraka fecesa kao neinvazivnog izvora DNK. Regija za citokrom B, koja je dosta homologna za sve 4 vrste, je umnožena PCR-om. Dobiveni ampliconi su obrađeni restrikcijskim nukleazama i nastali fragmenti su razdvojeni elektroforezom. Nastali uzorak raspodijele restrikcijskih fragmenata je bio dovoljno specifičan da se četiri vrste točno odrede (LUCENTINI i sur., 2006.).

2.3.3. Kratki ponavljajući sljedovi, STR (*Short Tandem Repeats*)

Kratki ponavljajući sljedovi se još nazivaju i mikrosateliti. Mikrosatelit je ulomak DNK u kojem se određeni DNK motivi, duljine 2, 3, 4, 5 i više parova baza, ponavljaju određeni broj puta. Naprimjer, sekvenca TATATATATA je dinukleotidni mikrosatelit koji se ponavlja 5 puta. Broj ponavljanja motiva varira od 5 do 50 puta, pa je cijeli molekularni biljeg relativno kratak, 100 do 400 parova baza. To je korisno u analizi degradirane DNK, za razliku od RFLP ulomaka čija duljina bude od 500 do 12 000 pb.

Mikrosateliti se pojavljuju na tisuću mjesta unutar genoma nekog organizma. Njihovoj raznolikosti i time korisnosti pridodaje viša stopa mutacija nego druga područja DNK. Mikrosateliti skupa sa minisatelitima sačinjavaju lokuse varijabilnog broja tandemskih ponavljanja, VNTR (*variable number tandem repeats*). Poželjne osobine nekog STR lokusa su: izražena učestalost heterozigotnosti, jasno definirani nizovi, jasno određene alelne varijante i jednostavno i pouzdano umnažanje. Razne varijante STR lokusa nekih gena su odgovorne za raznolikost krvnih grupa, serumskih proteina i transplatacijskih antigena na razini proteina. Svaki STR lokus je polimorfan ali je broj alela relativno malen, što znači da će određeni broj individua dijeliti isti STR lokus. Zato se, u humanoj forenzičkoj analizi, uvijek gleda veći broj STR lokusa i tako povećava diskriminatorna moć analize (PRIMORAC i sur., 2008.). Razne zemlje koriste razne sustave STR lokusa u svrhu DNK profiliranja, npr. američki CODIS sustav koji gleda 13 lokusa i DNK-17 sustav Ujedinjenog Kraljevstva. STR analiza se provodi multiplex PCR-om i to početnicama koje budu označene bojom radi lakše vizualizacije poslije. Umnoženi PCR produkti se učine vidljivima gel-DNK analitičkim strojevima, te danas s novim jednokapilarnim i višekapilarnim sustavima uz primjenu odgovarajućih softvera kojima se generira završni DNK profil. U populacijskog genetikci, STR su pomogli proučavanju genetičkih „uskih grla“, protoka gena, veličine populacije i indeksa fiksacije alela.

Pri forenzičkoj analizi jezgrine DNK u životinja se gotovo isključivo radi o analizi mikrosatelitskih ponavljanja. Analizom mikrosatelitskih ponavljanja, uporabom vrsno specifičnih početnica, dobiva se informacija o vrsti od koje uzorak potječe. Srođenost uobičajena u domaćih životinja smanjuje varijacije STR lokusa i time njihovu dokaznu vrijednost. S druge strane, utvrđeno je da pseći STR lokusi imaju jednaku diskriminatornu moć

kao i ljudski. Mnogi pseći STR lokusi i njihove početnice su opisani u literaturi i razvijene su baze podataka za potrebe forenzike, uzgoja pasa i provjere rodovnika. Unatoč tome, kao i postojanju brojnih multipleks kompleta, ne postoji međunarodni dogovor o standardnom setu biljega za određivanje pseće jedinke. Ako je uzorak degradiran, može se izgubiti dio jednog ili više mikrosatelita rezultirajući samo djelomičnim profilom. Moguća je i pojava null gena kada dođe do promjene sekvence ispred ili iza ciljanog mikrosatelita što onemogućuje PCR početnici da se veže (PRIMORAC i sur., 2008.).

2.3.4. Jednonukleotidni polimorfizmi (*single nucleotide polymorphism*)

Jednonukleotidni polimorfizam je zamjena jednog nukleotida na nekom mjestu u genomu drugim nukleotidom u određenom postotku populacije. Oni se mogu nalaziti u kodirajućem dijelu genoma, nekodirajućem dijelu ili regiji između 2 gena. Ukoliko su u kodirajućem dijelu, mogu rezultirati bolešću, većoj ili manjoj sklonosti oboljenju te drukčijem odgovoru organizma na kemikalije, cjepiva, lijekove i patogene. Poznati primjeri u ljudi su anemija srpastih stanica, β talasemija i cistična fibroza. Sa novim bioinformatičkim alatima moguće je proučavati strukturu neke populacije, protok i migraciju gena proučavajući učestalost prisutnih alelnih varijanti iz skupnih uzoraka umjesto testiranja svake jedinke zasebno.

U forenzici, SNP-i mogu biti dobra alternativa STR-ima ako je uzorak previše uništen. Oni ne mogu točno definirati osobu ali pomažu bliže odrediti etničku pripadnost, boju kose, očiju i sl. Analitičke metoda za otkrivanja novih i detekcije poznatih jednonukleotidnih polimorfizama su gel i kapilarna elektroforeza, masena spektrometrija, analiza hibridizacijom i RFLP. Neki primjeri životinjskih bolesti koje su uzrokovane supstitucijom samo jednog nukleotida su kompleksna vertebralna malformacija u krava, poremećaj funkcije leukocita u Holstein krava (BLAD, *bovine leukocyte adhesion deficiency*), gušavost koza i krava zbog mutacije u genu za tireoglobulin i mnoge druge (IBEAGHVA-AWEMU i sur., 2008.).

Mnogi SNP-zmi su gospodarski važni jer utječu na mnoga proizvodna svojstva pa se njihovim testiranjem nastoji unaprijediti uzgoj. SNP-zmi, za razliku od STR-a, dolaze isključivo u dvije alelne varijante u populaciji te su stabilniji, odnosno, ne mutiraju često.

2.3.5. Nova generacija sekvenciranja (NGS, *Next Generation Sequencing*)

Nova generacija sekvenciranja predstavlja znatan tehnološki napredak koji omogućuje napredak u poznavanju genoma životinja te sve širu primjenu u raznim područjima veterinarske medicine (VLAHOVIĆ i sur., 2020.). Prvi potpuni slijed nukleotida je određen za alanin tRNK pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* naporima F. Sangera i suradnika godine 1965. Njegova metoda terminacije sinteze lanca, skupa sa Maxam-Gilbertovom, sačinjavaju prvu generaciju metoda sekvenciranja koje za pretraživanje koriste elektroforezu na poliakrilamidnom gelu. Druga generacija sekvenciranja koja se temelji na tehnologiji visokopropusnih metoda (*high throughput*) obuhvaća pirosekvenciranje, sekvenciranje sintezom te ligacijsko sekvenciranje.

Treća generacija metoda sekvenciranja DNK uključuje sekvenciranje u stvarnom vremenu koja uključuje monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu i sekvenciranje pomoću nanopora. Glavne prednosti NGS-a su dobivanje velike količine informacija iz jednog uzorka, niska cijena po jedinici informacije, sposobnost izvođenja nepristranog sekvenciranja (bez prethodnog znanja o sadržaju DNK u uzorku) ili ciljanog sekvenciranje, visokokvalitetno određivanje slijeda nukleotida i široka primjenjivost (Slika 8.).

Razlikuje se cijelogenomsko sekvenciranje i cijeloegzomsko sekvenciranje, odnosno sekvenciranje samo kodirajućeg dijela genoma koji, u ljudi, iznosi oko 1%. NGS se, u širim područjima veterine, koristi za taksonomsko određivanje vrsta, u genskoj identifikaciji uzročnika bolesti, izučavanju genoma ugroženih vrsta, u uzgoju životinja, metagenomici, epigenetivi, transkriptomici i proteomici. Primjena NGS tehnologija ima moćnu, potencijalnu primjenjivost u veterini kao i svim ostalim biomedicinskim područjima i, kroz svoj napredak, će postajati sve učestalija. Glavni problem je razvoj računalnih programa koji moraju obraditi goleme količine podataka koji nastaju sekvenciranjem genoma (VLAHOVIĆ i sur., 2020.).

```

SIM FACCTCCCAGCTCCATCAAACTCTCATCTTGATGAAA 120
G .....A.....CTTTGGATCCCTCCTAGGAAATTTGCCTAATCTTACAAAATCCTGACAGGCCTATTTCCTAGCAATACACTATACATCCGACACA
C .....G.....TG.....TTTCGGCTCCCTATTAGCAGTCTGCCTATGACCCAAATCCTCACCAGCCTACTACTAGCCATGCGACTACACAGCAGACACA
B .....I.....I.....I.....I.....TTTCGGTTCCTCCTGGGAACTGCCTAATCTTACAAAATCCTCAGAGGCCTATTTCCTAGCAATACACTATACACTCCGACACA
S .....I.....I.....I.....I.....CTTTGGCTCTCCTCCTAGGCAATTTGCTTAATTTTACAGATTTCTAACAGGCCTATTTCCTAGCAATACACTATACACTCCGACACA
P .....G.....G.....G.....G.....CTTCGGTTCCTCCTTAGGCAATGCGCTAATCTTGCAAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACACTATACACTCCGACACA
H .....A.....A.....I.....A.....CTTCGGCTCCCTCCTAGGAAATGCGCTAATCTTCCAAAATCCTAACAGGCCTATTTCCTAGCCATACACTACACTCAGACACG
240
G ATAAACAGCATTCCTCTGTAACTCACAATTTGTCGAGATGTAATAATGCGTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGGG.....A.....A.....I.....CG.....CATACATATCCGGA
C TCCTTAGCCTT.....G.....G.....G.....G.....G.....ACGTACAATACCGCTGACTCATCCGGAATCTCCACGCAAACGGGCGCTCATTCTTCTTCTATCTGTATCTCCCTTCACATCCGGA
B ACAACAGCATT.....I.....I.....I.....I.....ACGTGAACTACGGTGAATCCTCCGATACATACACGCAAACGGG.....I.....A.....I.....I.....G.....I.....I.....TATGCAGTAGGA
S ACAACAGCATT.....I.....I.....I.....I.....ACGTGAACTAATGCGTGAATTAATCCGATATACACGCAAACGGG.....I.....I.....I.....I.....CG.....I.....TATGCATGTAGGA
P ACAACAGCTT.....A.....A.....I.....A.....ACGTAAATTACGGATGAGTTATTCGCTATCTACATGCAAACGGG.....I.....G.....A.....I.....I.....CG.....I.....CATCCAGTAGGC
H ACAACTGCCTT.....A.....G.....G.....G.....ACGTAACTACGGATGAATTAATTCGCTACCTCCATGCCAACGGG.....A.....A.....I.....I.....CG.....I.....CATTCAGTAGGA
360
G CGAGGTC.....I.....A.....I.....I.....AAACATGAAACATTGGAGTAACTCCTCTGCT.....G.....G.....GCTATGTTTTACCATGAGGACAAAATATCA
C CGAGG.....G.....G.....G.....CTCACAAGAAACCTGAAACACAGGAGTAACTCCTCTCTCAACTC.....G.....I.....I.....GCTATGTTCTCCCATGGGCAAATATCA
B CGAGGTTATATTACGGGCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATGGAGTAACTCTTCTGCTCAAGT.....I.....GATACGTCCTACCATGAGGACAAAATATCA
S CGAGG.....G.....I.....I.....I.....I.....AAACATGAAACATTGGAGTAACTCCTCTATTTGGCAATAGCCACAGCATTCATAGGCTATGCTTACCATGAGGACAAAATATCA
P CGAGGTC.....G.....G.....I.....I.....AAACATGAAACATTGGAGTAGTCTACTATT.....A.....CGT.....GCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAAATATCA
H CGGG.....G.....G.....I.....G.....AGACATGAAACATTGGAATCATCTACTT.....A.....AGT.....I.....GCTATGCTTACCATGAGGCAAATATCC
439
G TTTTGAGGGGC.....A.....I.....I.....I.....AATCCCATATATTGG.....A.....A.....A.....A.....
C TTCTGAGGGGC.....G.....I.....I.....I.....AATCCCTACATTTGGACAC.....A.....A.....CG.....
B TTCTGAGGAGC.....A.....G.....G.....AATCCCATACATCGG.....A.....ATT.....A.....
S TTCTGAGGAGC.....A.....I.....I.....I.....AATCCCATATATTGG.....A.....A.....A.....G.....
P TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAATCTACTATCAGGTATCCCTTATATCGG.....A.....AG.....A.....A.....
H TTTTGAGGAGC.....A.....G.....G.....AATTCCTACATCGGTACTACCCTCGTCGAGTGAACTGAG

```

Slika 8. Primjer prikaza rezultata sekvenciranja. Izvor: dr. sc. Snježana Ćurković

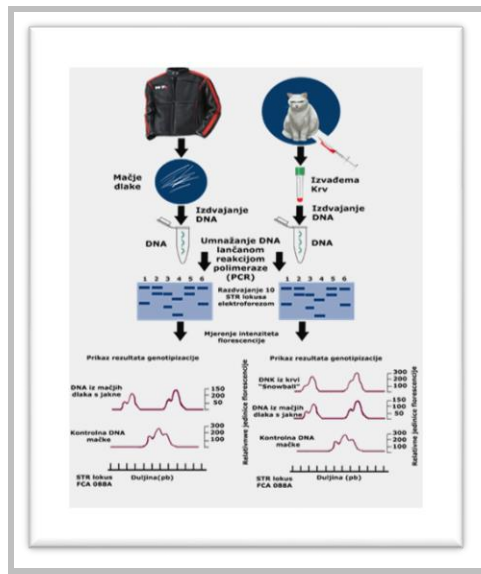
3. RASPRAVA

Suvremena molekularna biologija i genomika teži razumijevanju mehanizama odgovornih za nasljeđivanje i ekspresiju genetičkih informacija koje određuju strukturu i funkciju stanice. Danas dobro definirane metode izolacije deoksiribonukleinske kiseline (DNK), molekule iz stanica, porijeklom ili od eukariota ili od prokariota, omogućuju razlikovanje bilo koje pojedinačne jedinice neovisno o genetskoj sličnosti svojstvenoj za vrstu ili rodbinsko/filogenetskoj bliskosti s drugim jedinkama. Tako genetička raznolikost pasmina pasa distribuirana je ovisno o pojedinim regijama. Potvrda rodoslovlja na DNK razini setom visoko polimorfnih genskih biljega služi za provjeru vjerodostojnosti podataka o životinjama, te se dobiva uvid u slučajne ili namjerne greške u vođenju podataka. Za potrebe genotipizacije pasa, potrebno je prvenstveno napraviti DNK bazu profila čistokrvnih pasmina. Baze podataka osnova su DNK analize i interpretacije rezultata DNK analize. Učestalosti pojedinih alela se izračunavaju na osnovu učestalosti alela na određenim genskim lokusima određene populacije, a služe za izračun vjerojatnost identifikacije za forenzične svrhe, utvrđivanje očinstva i pasmina. Naime, iznimno brz razvoj istraživanja vezanih uz molekulu DNK nudi neslućene mogućnosti u područjima veterinarske medicine, napose onih u genetici, imunologiji, vakcinologiji, farmakologiji, forenzici i sl. Pri tom vrlo je značajna njihova primjena pri razumijevanju molekularnih mehanizama patogeneze bolesti, stimulaciji dizajniranja novih lijekova i cjepiva, te novih pristupa za primjenu DNK dijagnostike i genske

terapije. Svaka životinja u prirodi razlikuje se od druge životinje, pri čemu se njezin identitet ovisno o vrsti i pasmini može vrlo jednostavno utvrditi. Međutim, životinje iste vrste/pasmine vrlo su slične te se ne mogu razlikovati bez primjene određenih metoda koje u postupku identifikacije koriste detalje po kojima se one ipak razlikuju. Utvrditi identitet životinje znači nesumnjivo utvrditi sva ona pravna i fizička obilježja, po kojem se jedna životinja razlikuje od druge. S gledišta veterinarske medicine, identifikacija životinja jedan je od važnijih postupaka za struku, kako u postupku procjenjivanja kontrole kvalitete praćenja zdravstvenog stanja životinja, tako i tijekom praćenja prometa domaćih i drugih životinja i životinjskih proizvoda u cilju nadzora lanca ishrane, odnosno kontrole uvoza i izvoza, rezidua te dobrobiti životinja. Tako, identitet predstavlja ukupnost nepromjenjivih obilježja koja čine određenu životinju, a prema kojima se ona može razlikovati od svih drugih. Da bi se neko obilježje moglo koristiti u procesu identifikacije životinje mora imati sljedeće osobitosti: univerzalnost (da ga posjeduje svaka životinja ovisno o vrsti), individualnost (da je različito kod svake životinje unutar vrste), trajnost i nepromjenjivost. Pri tome je vrlo značajno da ima mogućnost izdvajanja iz ukupnosti obilježja životinje. Danas kao jedna od osnovnih metoda individualizacije životinje u veterinarskoj medicini je analiza njezinog DNK profila, pri čemu se ista izolirava iz bioloških tragova poput krvi, izmeta, mokraće, sline, dlake, odnosno tkiva (kost, zub i sl.). Stanica, kao najmanja strukturna i funkcionalna jedinica svakog eukariotskog organizma, pa tako i životinjskog, sadrži u jezgri jezgrinu DNK, dok u citoplazmi u staničnom organelu mitohondriju mitohondrijsku DNK (mtDNK).

S obzirom na činjenicu da se slijed nukleotida DNK između jedinki iste vrste razlikuje u svega 0,5 do 1% s velikom se sigurnošću može tvrditi da svaka jedinka (osim jednojajčanih blizanaca) ima svoj jedinstveni DNK profil, pri čemu su mikrosateliti (od engl. *short tandem repeats*, STR-lokusi) najvažniji i najpogodniji genetski biljezi molekularno genetskim istraživanjima budući da su visoko polimorfni i pogodni za pojedinačnu tipizaciju DNK, odnosno izradu genetskog profila jedinke. Utvrđeno je da su među kralježnjacima jedino u genomima ptica mikrosatelitski lokusi relativno rijetki. Korištenjem metode lančane reakcije polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) spoznalo se da mikrosateliti mogu biti vrlo korisni mendelovi biljezi. U cjelokupnom periodu istraživanja mikrosatelita pažnja je početno više bila usmjerena na samu detekciju, građu i učestalost alela, dok se u posljednje vrijeme više pažnje posvećuje fenotipskoj ulozi mikrosatelita. Od prvotnog zanemarivanja njihove uloge došlo se do spoznaja o brojnim posljedicama promjena mikrosatelitnih alela. Zbog toga se mikrosateliti često koriste u analizama bioloških materijala porijeklom iz različitih izvora kao

što su dlaka, krv i koža. Najpoznatiji, a ujedno i prvi poznati slučaj u kojem je trag životinjskog podrijetla bio poveznica osumnjičenika za ubojstvo i mjesta zločina, je iz 1994. pod nazivom Snowball. Naime, na kožnoj jakni uprljanoj krvlju žrtve i pronađenoj na mjestu ubojstva izuzeto je nekoliko primjeraka bijele dlake. Analizom jezgrine DNK primjenom deset specifičnih mikrosatelitskih biljega mačke utvrđeno je da su dlake pripadale mački koja je živjela s počiniteljem kaznenog djela. Kako se mačka zvala Snowball, tako je cijeli slučaj dobio ime po kućnom ljubimcu (Slika 9.).



Slika 9. Utvrđivanje genotipa mačke Snowball i mačjih dlaka sa jakne osumnjičenog pomoću kojeg je otkriven ubojica - slučaj poznat pod nazivom „Snowball case“. Izvor: „Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu“, (PRIMORAC i sur., 2008)

Neposredno prije svake analize bioloških tragova animalnog podrijetla primjenom DNK metoda uzorci moraju sadržavati stanične organele poput jezgre i/ili mitohondrija iz kojih je moguće izolirati jezgrinu ili mitohondrijsku DNK. Tako se po strogo određenim protokolima životinjska jezgrina ili mitohondrijska DNK može izdvojiti iz svježe krvi, osušenih tragova krvi, svježih tragova krvi, stanica sluznice usta ili nosa, kosti, zubi, fecesa, mišića, krzna, dlake, organa, sline, sjemena i urina, ili iz epitelnih stanice na ogrlici životinje i sl.. Biološki tragovi životinja koji nisu potencijalni izvori DNK su serum, suze, znoj i sl. Nakon što se uzorak životinjskih bioloških tragova dostavi u DNK laboratorije potrebno je odrediti metodu izolacije DNK pri čemu je preporuka napraviti kontrolu kvalitete dostavljenog uzorka s obzirom da količina izolirane molekule DNK ovisno o vrsti biološkog materijala. Shodno tome, prije no

što se pristupi odabiru metode izolacije DNK, od interesa je metodom DNK citometrije u samom biološkom uzorku odrediti postotak stanične populacije uzorka ovisno o fazi staničnog ciklusa na osnovi čega je moguće odrediti veličinu uzorka potrebnog za izoliranje optimalne količine DNK. Količina uzorka potrebnog za analizu metodom DNK citometrije je minimalno 1×10^4 stanica venske krvi, 3- 4 mL punktata koštane srži, 0,5 mg solidnog tkiva ili 0,5 cm². Naime, većina stanica kralješnjaka u tkivima nalazi se u fazi mirovanja (Go) ili presintetskoj fazi (G1). Ukoliko se metodom DNK citometrije utvrdi zadovoljavajuća kvaliteta uzorka s obzirom na količinu DNK pristupa se njezinoj izolaciji i to pomoću u veterinarskoj medicini najčešće korištenih metoda izolacije poput: izdvajanja DNK pomoću organskih otapala, Chelex metoda te metoda ispiranja s FTA-papira. Prednost primjene metode izolacije DNK pomoću organskih otapala je što se može primijeniti na različitim uzorcima bioloških tragova životinjskog podrijetla pri čemu se uklanja velika količina proteina. Također metodom se izdvajaju veliki dijelovi DNK koji su čišći u odnosu na DNK izdvojen drugima postupcima izolacije. Metoda izdvajanja DNK upotrebom Chelex® 100 koristi se pri izdvajanju DNK iz uzoraka u kojima se očekuje vrlo mala količina DNK. Izdvajanje DNK pomoću FTA kartica je jedna od najjednostavnijih i najbržih metoda prikupljanja bioloških tragova obriska sluznice usta ili nosa životinja te krvnih mrlja. Danas se u DNK laboratorijima za izolaciju DNK iz uzoraka pera, kosti, zuba ili rogovlja najčešće se koriste komercijalni kitovi (QIAGEN, GmbH, Hilden, Njemačka) ili protokoli pomoću organskih otapala (fenol kloroform izolacija), dok se komercijalni kit Wizard Genomic DNK Purification Kit (Promega) koristi za izolaciju DNK iz uzoraka mišića, organa i kože. Nadalje, kao najuspješnija metode izdvajanja DNK iz uzorka izmeta životinja pokazale su se metoda s cetil-trimetil amonijevim bromidom (CTAB) te potom primjena komercijalnih testova. Nakon što se primjeni najbolja metoda izolacije DNK molekulu u uzorcima, u laboratorijima se neovisno o porijeklu izolirane DNK provodi analiza njezine kakvoće te kvantifikacija do samog sekvenciranja.

4. ZAKLJUČAK

Temeljem svega prethodno prikazanog, u veterinarskoj medicini od velikog je interesa daljnje usavršavanjem tehnika izolacije DNK molekule ovisno o vrsti i porijeklu biološkog materijala.

Naime, od interesa je razvijati metodologiju izolacije DNK iz što manjeg uzorka životinjskog porijekla, te svakako smanjenje troškova financijskih iznosa za reagense i uređaje kako bi se dodatno opremili molekularni laboratoriji kojima je interes DNK analiza porijeklom od životinja.

5. LITERATURA

AMBRIOVIĆ, RISTOV, A., A. BROZOVIĆ, B. BRUVO MAĐARIĆ, H. ČETKOVIĆ, M. HERAK BOSNAR, D. HRANILOVIĆ, S. KATUŠIĆ HEĆIMOVIĆ, N. MEŠTROVIĆ RADAN, S. MIHALJEVIĆ, N. SLADE, D. VUJAKLIJA (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Sveučilišni priručnik Sveučilišta u Zagrebu

AVERY, O. T., C. M. MACLEOD, M. MCCARTY (1944): Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of the Pneumococcal Types-Induction of the Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* 79, 2, 137–158.

BERGET, S. M., C. MOORE, P. A. SHARP (1977): Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus late mRNK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (8): 3171–5.

BIASE, F. H., M. M. FRANCO, L. R. GOULART, R. C. ANTUNES (2002): Protocol for extraction of genomic DNK from swine solid tissues. *Genet. Mol. Biol.* 25, 3, 313-315.

CATTANEO, C., D. M. SMILLIE, K. GELSTHORPE, A. PICCININI, A. R. GELSTHORPE, R. J. SOKOL (1995): A simple method for extracting DNK from old skeletal material. *Forensic Sci Int.*, 28, 74 (3), 167-174.

CHARGAFF, E., S. ZAMENHOF, C. GREEN (1950): Composition of human desoxypentose nucleic acid. *Nature.* 165, 4202, 756–7.

DAKIN, E. E., J. C. AVISE (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93; 504-509.

CHOW, L. T., R. L. GELINAS, T. R. BROKER, R. J. ROBERTS (1977): An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNK. *Cell.* 12 (1): 1–8.

- GALOV, A., K. BRVNE, M. ĐURAS GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, Z. NUSHOL, D. VINCEK, I. KOCIJAN, Z. TADIĆ, V. BENKOVIĆ, I. BAŠIĆ, S. M. FUNK (2005): Effectiveness of nine polymorphic microsatellite 36se din36in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93; 277-282.
- HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL, J. R. de WARD (2003): Biological identifications through DNK barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 1512, 313–321.
- HEIKRUJAM, J., R. KISHOR., P. B. MAZUMDER (2020): *The Chemistry Behind Plant DNK Isolation Protocols, Biochemical Analysis Tools – Methods for Bio-Molecules Studies*, 8. poglavlje.
- IBEAGHVA-AWEMU, E. M., P. KGWATALALA, A. E. IBEAGHA, X. ZHAO (2008): A critical analysis of disease-associated DNK polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mamalian Genome*, 19(4): 226–245.
- JEFFREYS, A. J., V. WILSON, S. L. THEIN (1985): Hypervariable „minisatelite“ regions in human DNK. *Nature* 1985, 314, 67-73.
- KAFATOS, F. C., C. W. JONES, A. EFSTRADIADIS (1979): Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24; 7(6): 1541–1552.
- LUCENTINI, L., F. VERCILLO, A. PALOMBA, F. PANARA, B. RAGNI (2006): A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*. *Conserv. Genet.* 8, 757-759.
- MESELSON, M., F. W. STAHL, J. VINOGRAD (1957): EQUILIBRIUM SEDIMENTATION OF MACROMOLECULES IN DENSITY GRADIENTS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 15;44(7):671-82
- MILLER, S. A., D. D. DYKES, H. F. POLESKY (1988): A simple salting out procedure for extracting DNK from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, 16, 3, 12-15.
- NASIR A, R. de C. P. RAMPAZZO, A. D. T. COSTA, M. A. KRIEGER (2017): Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Res. Int.*, 2017: 9306564

NEFF B. D., M. R. GROSS (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55; 1717-1733.

NESVADBOVÁ, M., A. KNOLL, A. VAŠÁTKOVÁ (2010): Selection of the most suitable method for the extraction of DNK from foods and feeds for species identification. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58, 2, 169-174.

PEČINA-ŠLAUS, N. i sur. *Metode molekularne biologije Medicinska naklada*, Zagreb 2009.

PRIMORAC, DRAGAN, D. MARJANOVIĆ (2008): *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. 1. izdanje. Medicinska naklada d. o. o., Zagreb, Rijeka

PRIMORAC, D., S. S. BUTORAC, M. ADAMOVIĆ (2009): *Analiza DNK u sudskoj medicini*. *Hrvatski ljetopis za kazneno pravo i praksu*, 16(1);3-26.

PRIMORAC, D., M. SCHANFIELD (2014): *Forensic DNK Applications: An Interdisciplinary Perspective*. 1st ed. CRC Press Taylor and Francis, New York.

RAHMAN ERNKNTO, A., D. AFIFAH, I. LESMANA, B. S. DARYONO (2018): Isolation of DNK from chicken (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) feather with lysis buffer-phenol chloroform isoamyl alcohol method (PCI) and Chelex method. *AIP Conference Proceedings* 2002, 1, 10.1063/1.5050098.

R. C. RIVERO, E., A. C. NEVES, M. G. SILVA-VENEZUELA, S. O. M. SOUSA, F. D. NUNES (2006): Simple salting-out method for DNK extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol. Res. Pract.* 202(7), 523-9.

R. NOLES, S. (2008) *Traditional Methods for CsCl Isolation of Plasmid DNK by Ultracentrifugation*, Thermo Fisher Scientific, Application Note: AN-LECF-PLASDNK-0408.

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS, H. A. ERLICH (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNK with thermostable DNK polymerase. *Science* 1988, 239, 487-491.

SAMSUWAN, JARUNYA, T. SOMBOONCHOEPISAL, T. AKARPUTTIPORN, T. SRIMUANG, P. PHUENGSAUKDAENG, A. SUWANNARAT, A. MUTIRANGURA, N. KITKUMTHORN (2018): A method for extracting DNK from hard tissues for use in forensic identification. *Biomed. Rep.* (srpanj, 2018), 433-438.

SINGH, U. A., M. KUMARI, S. IYENGAR (2018): Method for improving the quality of genomic DNK obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*, 20:12

VLAHOVIĆ, K., G. GREGURIĆ GRAČNER, M. PAVLAK, D. ŠPOLJARIĆ, L. PAJURIN, M. POPOVIĆ (2020): Nova generacija sekvenciranja u veterinarskoj medicini – pregled, 1. i 2. dio, *Vet. stn.* 51 (2) (3).

WALSH, P. SEAN, D. A. METZGER, R. HIGUCHI (1991): Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNK for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 10,4, 506-513.

WATSON J. D., F.H.C. CRICK (1953): A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171, 4356, 737–738.

YAN, D., J. Y. LUO, Y. M. HAN, C. P., XIAO, P. DONG, S. L. CHEN, L. G. SUN, X. H. XIAO (2013): Forensic DNK barcoding and bio-response studies of animal horn products 38se din traditional medicine. *PloS One*. 2013, 8(2), e55854.

6. SAŽETAK

Deoksiribonukleinska kiselina je molekula sastavljena od 2 polinukleotidna lanca, međusobno povezana vodikovim vezama, koji se spiralno uvijaju. Svaki je lanac polimer nukleotida, osnovne jedinice koja je sastavljena od jedne dušične baze, šećera deoksiriboze i fosfatne skupine. Lanci su međusobno komplementarni i antiparalelni, a tri nukleotida predstavljaju osnovnu kodirajuću jedinicu, kodon. Kodon kodira određenu aminokiselinu, one se dalje spajaju u polipeptidni lanac pa u protein te, na taj način, DNK nosi informaciju svih funkcija i osobina organizma. Molekula DNK je kompaktno složena u kromosome čiji je broj vrsno specifičan. Kromosomi su smješteni u staničnoj jezgri i predstavljaju genomsku DNK nekog organizama. Neke stanične strukture imaju vlastitu DNK kao što su mitohondriji, bakterijski plazmidi i biljni koloroplasti. Izolacija DNK je danas neizostavan i rutinski postupak u molekularnoj dijagnostici. Prva izolacija DNK je napravljena 1869. godine od strane švicarskog doktora i biologa, Friedricha Mieschera. Danas su razvijene mnogobrojne

metode i njihove varijacije koji se odabiru ovisno o vrsti uzorka s ciljem izolacije što kvalitetnije i veće količine nukleinskih kiselina. Sve te metode imaju neke zajedničke korake; skupljanje stanica, otapanje stanične membrane s raznim deterdžentima i surfaktantima, liza proteina i RNK (po potrebi), odvajanje nepotrebnog debrisa, centrifugiranje i pročišćavanje dobivenih nukleinskih kiselina. Čistoća i koncentracija dobivene DNK se zatim ispituje spektrofotometrijom na raznim valnim duljinama i mjerenjem apsorbancije. Kvantifikacija se još može provesti sa rezanjem specifičnim restrikcijskim enzimima i bojenjem etidijevim bromidom. Izolirana DNK se dalje analizira raznim PCR metodama, RFLP analizama, Southern blotting i dr. Uzorci mogu biti razne vrste tkiva, dlaka, tjelesne tekućine, stolica, klinički dobiveni biopsati, FNA dobivene stanice, krv i serum, histološki preparati, kosti, zubi, nokti, sperma, mlijeko, perje, itd. Metode ekstrakcije se mogu podijeliti na metode organske ekstrakcije, metode izdvajanja na silika gelu, magnetsku separaciju, tehnologiju anionske izmjene te ostale. Primarna važnost izdvajanja DNK je u proučavanju genetskih uzroka bolesti, razvoju dijagnostike i lijekova, kao i samog istraživanja njene građe i funkcije. U životinja DNK se izdvaja i analizira u forenzičke svrhe, radi certificiranja čistokrvnih životinja, utvrđivanje očinstva u leglu, trajnog dokaza identiteta i podrijetla, utvrđivanja stupnja srodnosti prije parenja i sklonosti nekim zdravstvenim problemima. Za forenzičke potrebe, razlikuje se forenzička entomologija i forenzička analiza kralježaka. Analiza DNK kukaca ima za zadatak pomoći odrediti vrijeme, mjesto i način smrti u sudskomedicinskim slučajevima, kao i u slučajevima upitne provedbe mjera dezinfekcije i skladištenja hrane. DNK kralježnjaka, poglavito psa i mačke u sudskomedicinske svrhe, se izdvaja kada je životinja „svjedok“, žrtva ili počinitelj. Prehrambeni proizvodi životinjskog podrijetla, i za ljude i za životinje, podliježu kontroli svog deklariranog sastava. Ovaj će rad obuhvatiti neke od najčešćih metoda izolacije ovisno o podrijetlu uzorka, metode kvantifikacije dobivene DNK i moguće daljnje analize ovisno o metodi izolacije.

Ključne riječi: DNK, RNK, izolacija DNK, kvantificiranje DNK, PCR, qPCR, kromosomi, nukleotidi, forenzika

7. SUMMARY

ISOLATION OF DNA MOLECULE BASED ON TYPE OF MATERIAL OF ANIMAL ORIGIN

Deoxyribonucleic acid is a molecule composed of two polynucleotide chains, interlinked with hydrogen bonds and coiling around each other. Each chain is a polymer of nucleotides, basic monomeric units. One nucleotide is composed of one of possible four nitrogen containing nucleobases, sugar deoxyribose and a phosphate group. Chains are mutually complementary and antiparallel with sequence of three nucleotides representing basic coding unit, codon. One codon stands for certain amino acid and they connect into polypeptide chain and further into protein thus the DNK carries information about all functions and characteristics of organism. DNK molecule is organized into structures called chromosomes whose number is species specific. Chromosomes are placed into cell nucleus and represent genomic DNK of that organism. Some cellular structures have their own DNK as bacterial plasmids, plant chloroplasts and mitochondria. DNK extraction is, today, routine and indispensable procedure in molecular diagnostics. First successful extraction was done in 1869 by a Swiss physician and biologist, Friedrich Miescher. Today there are many developed methods, and their variations, which are selected based on a type of sample and with the goal to extract as much amount as possible and best quality too. All these methods have some common steps; collecting cells, lysing of the cell wall with detergents and surfactants, protein lysis and RNK (if not needed), removal of unnecessary debris, centrifugation and purification of acquired nucleic acids. Purity and concentration of given DNK are tested through spectrophotometry on different wave lengths and measuring absorbance. Quantification can also be measured by cutting sample with restriction enzymes and dyeing with ethidium bromide. Isolated DNK is further analyzed with many PCR methods, RFLP analysis, Southern blotting, etc. Samples can be all sorts of tissues, hairs, body fluids, stool, clinically acquired biopsies, FNA acquired cells, blood and serum, histological samples, bones, teeth, nails, semen, milk, feathers, etc. Extraction methods can be divided into organic extraction methods, separation on silica gel, magnetic separation, anionic exchange based technology methods and others. Biggest relevance of DNK extraction is to study genetic causes of diseases, development of diagnostics and treatment and to further investigate structure and function of DNK. In animals, DNK is isolated and analyzed for forensic purposes, to certify purebred animals, determining

fatherhood in offspring, as a permanent evidence of identity and origin, determining degree of cognation before mating and proneness to certain diseases and conditions. In forensic science, we distinguish between forensic entomology and forensic analysis of vertebrates. Insects DNA analysis is used to help determine time, place and way of death in forensic cases as in cases of questionable implementation of disinsection and food storage measures. Vertebrate DNA, mainly cats and dogs is used in forensic cases when animal can be in role of witness, victim or perpetrator. Food product of animal origin, for use in humans and animals, are subject to control of their declared composition. This graduate thesis will incorporate some of most common methods of DNA extraction depending on the type of sample, methods of quantification of obtained DNA and possibilities of downstream applications depending on method of isolation.

Key words: DNA, RNA, DNA isolation, DNA quantification, PCR, qPCR, chromosomes, nucleotides, forensics

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ksenija Straček
Datum rođenja: 26. lipnja 1994.
Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska
Mjesto stanovanja: Slovenska 2, 10000 Zagreb

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

Fakultet: Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet (2014-
Srednja škola: Škola za medicinske sestre Vinogradska, Zagreb, Hrvatska (2009-2013)
Osnovna škola: OŠ Petra Zrinskog, Zagreb, Hrvatska (2001-2009)

IZVANNASTAVNE AKTIVNOSTI

Volontiranje u Ambulanti za male životinje “Šegota” (kolovoz 2020.- ožujak 2021.)

POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Strani jezici: suvereno vladanje engleskim jezikom

Poznavanje programa Microsoft Office

Vozačka dozvola B kategorije